

(19) 日本国特許庁 (J P)

## (12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-184837

(43) 公開日 平成9年(1997)7月15日

(51) Int.Cl. <sup>9</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 31/22	1 2 1		G 0 1 N 31/22	1 2 1 F 1 2 1 G
21/78			21/78	B
33/52			33/52	B

審査請求 未請求 請求項の数21 O L (全 21 頁)

(21) 出願番号 特願平8-279661

(22) 出願日 平成8年(1996)10月22日

(31) 優先権主張番号 特願平7-282148

(32) 優先日 平7(1995)10月30日

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 000141897

株式会社京都第一科学

京都府京都市南区東九条西明田町57番地

(72) 発明者 片山 敦子

京都府京都市南区東九条西明田町57番地株

式会社京都第一科学内

(72) 発明者 福岡 隆夫

京都府京都市南区東九条西明田町57番地株

式会社京都第一科学内

(72) 発明者 米原 聡

京都府京都市南区東九条西明田町57番地株

式会社京都第一科学内

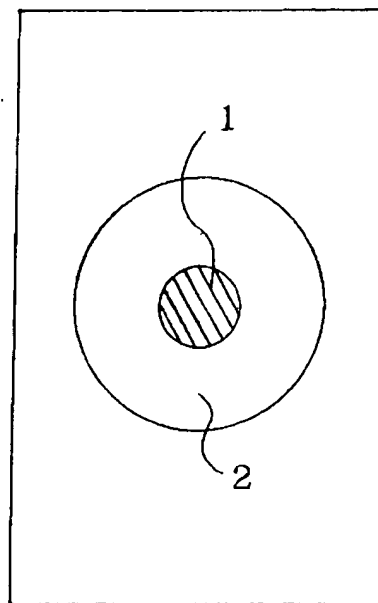
(74) 代理人 弁理士 遠山 勉 (外2名)

(54) 【発明の名称】 試験片

(57) 【要約】

【課題】 色素等の拡散・溶出を抑制し、正確な検査・分析を可能にする分析用試験片を提供することである。

【解決手段】 試料中の分析対象物質と試薬とが反応して生成する検出可能な物質を測定することにより前記分析対象物質を測定するための分析用試験片において、前記検出可能な物質を検出するための検出部を有する試験部を1以上設け、前記検出部に層状無機化合物（合成スメクタイト等）を含有させる。



**【特許請求の範囲】**

【請求項1】 試料中の分析対象物質と試薬とが反応して生成する検出可能な物質を測定することにより前記分析対象物質を測定するための分析用試験片であって、前記検出可能な物質を検出するための検出部を有する試験部を1以上備え、少なくとも前記検出部に層状無機化合物を含有する試験片。

【請求項2】 検出部として検出可能な物質を検出するための検出層を含む、2以上の層からなる試験部を1以上備え、少なくとも前記検出層に層状無機化合物を含有する、請求項1記載の試験片。

【請求項3】 前記試験部が、さらに試料を拡散するための拡散層を含み、試料が前記拡散層を通して拡散し前記検出層に到達するようにしたことを特徴とする、請求項2記載の試験片。

【請求項4】 検出部として検出可能な物質を検出するための検出領域を有する試験部を1以上備え、少なくとも前記検出領域に層状無機化合物を含有する、請求項1記載の試験片。

【請求項5】 前記試験部が、さらに前記試料を拡散するための拡散領域を有し、試料が前記拡散領域を通して拡散し前記検出領域に到達するようにしたことを特徴とする、請求項4記載の試験片。

【請求項6】 前記検出領域が、検出可能な物質を検出するための検出層を含む2以上の層からなる、請求項4又は5記載の試験片。

【請求項7】 前記試験部が、さらに試料中の分析対象物質と試薬とが反応するための反応部を有し、前記検出可能な物質が前記反応部で生成されるようにしたことを特徴とする、請求項1～6のいずれかに記載の試験片。

【請求項8】 前記検出部が、試料が拡散して前記反応部を通過した後の位置に設けられていることを特徴とする、請求項7記載の試験片。

【請求項9】 前記検出可能な物質が、前記検出部において試料中の分析対象物質と試薬との反応により生成することを特徴とする、請求項1～6のいずれかに記載の試験片。

【請求項10】 前記試験片における層状無機化合物を含有する部分が多孔質構造体からなるものである、請求項1～9のいずれかに記載の試験片。

【請求項11】 前記多孔質構造体が、前記層状無機化合物によって形成されているか、又は親水性ポリマー、メンブランフィルター、繊維集合体、及び有機化合物もしくは無機化合物の微粉末からなる群から選ばれる少なくとも1種と前記層状無機化合物とによって形成されている、請求項10記載の試験片。

【請求項12】 層状無機化合物が2:1型粘土鉱物である、請求項1～11のいずれかに記載の試験片。

【請求項13】 2:1型粘土鉱物が膨潤性層状粘土鉱物である、請求項12記載の試験片。

【請求項14】 膨潤性層状粘土鉱物がベントナイト、スメクタイト、バーミキュライト及び合成フッ素雲母から選ばれる少なくとも一種である、請求項13記載の試験片。

【請求項15】 スメクタイトが合成スメクタイトである、請求項14記載の試験片

【請求項16】 合成スメクタイトが、ヘクトライトおよびサポナイトからなる群から選ばれる少なくとも一種である、請求項15記載の試験片。

【請求項17】 前記試験部に試薬が含有されている、請求項1～16のいずれかに記載の試験片。

【請求項18】 試薬が、試験部への試料の添加前及び／又は添加後に試薬を溶解した試薬溶液を添加することにより前記試験部に含有される、請求項17記載の試験片。

【請求項19】 層状無機化合物を含有する部分に、更に緩衝剤またはその乾燥物が含まれる、請求項1～18のいずれかに記載の試験片。

【請求項20】 試薬が、分析対象物質と反応して光学的方法によって検出可能な物質を生成しうるものである、請求項1～19のいずれかに記載の試験片。

【請求項21】 光学的方法によって検出可能な物質が水溶性である、請求項20記載の試験片。

**【発明の詳細な説明】****【0001】**

【発明の属する技術分野】本発明は、液体中の分析対象物質を検出・測定するための乾式の試験片に関する。詳しくは、本発明は、色素等の拡散・溶出を抑制して検出・測定の感度及び精度を高め、また取り扱いを簡便ならしめた試験片に関する。

**【0002】**

【従来の技術】尿等の液体中の成分を検査・分析するための試験片は、通常、試料液の吸収、拡散、反応、検出など一連の分析プロセスを担う機能的な部分である試験部と、試験部を支持する支持部とからなり、さらに必要に応じセンサー、試料液吸入装置等を有する。そして、前記試験部はさらに種々の機能を担う層や領域などの部分からなり、一般的には、試料液を吸入し試験部内に導入するための試料吸入部、試料液を試験部内で均一に浸透・拡散させるための拡散浸透部、試料中に含まれる分析対象物質と反応する試薬を含む試薬部、検出反応などの反応がおきる反応部、試料中の成分や検出反応で生成する色素等を吸着や分配などのクロマトグラフィー類似の作用で分離する展開部、試料液が移動する時間を利用して反応の進行を調整するための時間調整部、試料中の成分や生成する色素等を吸着作用でトラップし、又は除去するための保持部、反射率や透過吸収、蛍光などで色素等を検出する検出部、過剰の試料液、添加された洗浄液や展開液を吸収し逆流を防止する吸収部等の各部からなる。

【0003】実際の試験片では、必ずしもこれらの各機能を担う部分が各々独立して存在するとは限らず、例えば検出部が試料吸入部、試薬部、反応部と同一であるリトマス試験紙のように、一つの部で複数の機能を兼ね備える場合がある。

【0004】また、例えば試料吸入層を兼ねる拡散層、試薬層と反応層とを兼ねる検出層、あるいは試薬層を兼ねる反応層と独立した検出層を備える単層型又は多層型の試験片を挙げることできる。これらの多くは支持体上に接着層によって貼り付けられている。反応層と検出層の間などに妨害成分を除去するなどの作用を有する展開層ないしは保持層を持つ場合もある。拡散層が展開層を兼ね、接着層によって試薬層に接している場合もある。検出が反射率測定によって行われる場合では、検出層の前後に反射層を設ける場合もある。試料液は、試料吸入層を兼ねる拡散層に点着され、均一に拡散しながら試薬層内の試薬を溶解させることにより反応が進行し、例えば色素前駆体から色素が生成する。試薬層と反応層が検出層を兼ねる場合ではそのまま測定されるが、独立した検出層を備える場合では生成した色素等がさらに検出層に浸透移動し、その時点で測定される。(H. G. Curme, et al., Clinical Chemistry, 24(8), 1335-1342(1978)、B. Walter, Analytical Chemistry, 55(4), 498A(1983)、近藤朝士「ぶんせき」1984(7), 534、近藤朝士「ぶんせき」1986(6), 387、分析化学便覧第8頁(日本分析化学会編:改訂4版、丸善(1991))、特開平6-213886(北島昌夫ら)参照。)

【0005】また、例えばろ紙細片上の試験片の末端に展開液の浸透部を有し、そのとなりに試料吸入部を備え、その中央寄りに試薬部(酵素を固定)を兼ねた反応部を備え、さらにその先に試薬部(色素前駆体等を固定)と反応部と保持部を兼ねた検出部を備えた、試料液等の平面的な移動を利用する試験片が挙げられる。この場合、試料液を試料吸入部に点着した後、試験片の末端から展開液を浸透させて毛細管作用で試料を移動させ、最初の試薬部(酵素を固定)を兼ねた反応部で酵素と反応して過酸化水素を生成し、さらに生成した過酸化水素が展開液によって移動して2番目の試薬部(色素前駆体等を固定)と反応部と保持部を兼ねた検出部において色素前駆体等を呈色させ、生成した色素等(検出可能な物質)を吸着保持する。展開液の移動と共に過酸化水素が移動し、その移動と共に呈色反応がおきるので、分析対象物質の量が増すと呈色する幅が長くなり、これにより物質を測定することができる。(M. P. Allen, et al., Clinical Chemistry, 36(9), 1591-1597(1990)、D. Noble, Analytical Chemistry, 65(23), 1037A(1993)参照。)

【0006】このような試験片は尿試験、生化学試験、イムノクロマト試験等に用いられている。イムノクロマト試験片の例としては、例えば抗体を固定化したろ紙

(全面が試薬部、反応部、展開部、保持部、及び検出部と言ってもよい)の一端を、試薬である酵素固定化抗原と、抗原(分析対象物質)を含む試料を混合した展開液に浸漬して展開させ、次いで、2番目の試薬である発色液(色素前駆体を含む)で展開すると、あらかじめ展開され捕捉されていた酵素固定化抗原が存在する部分が帯状に呈色する。この呈色する帯の長さは試料中の抗原の量に比例する。(R. F. Zuk, et al., Clinical Chemistry, 31(7), 1144-1150(1985)参照。)

【0007】また、イムノクロマト試験片の他の例として、メンブランフィルター細片上の一端に試料吸入部を兼ねた試薬部(第1抗体固定化着色ラテックス)を備え、中央寄りに展開部を兼ねる試薬部(第1抗体と同じ抗原を認識するがエпитープが異なる第2抗体)を備え、次いで展開部を備え、さらに試薬部(抗第1抗体抗体)と保持部を兼ねる検出部を備えた試験片が挙げられる。試料吸入部に試料液を点着すると、抗原(分析対象物質)と第1抗体が抗原抗体反応を起こし、免疫複合体のまま試料液の移動と共に移動し、展開部を兼ねる試薬部において第2抗体とサンドイッチ反応を生じる。しかし、免疫複合体を作らない過剰の第1抗体は、試料液の移動とともに展開部を通過し、試薬部(抗第1抗体抗体)と保持部を兼ねる検出部において捕捉される。第1抗体が固定化されている着色ラテックス(検出可能な物質の色素を含む)の呈色を測定することにより分析対象物質を測定することができる。(I. W. Davidson, Analytical Proceedings, 29, 459(1992)参照。)

【0008】しかし、上述した種々の試験片において、分析すべき成分との反応により生成する色素等は、多くの場合試料液、反応液等に対する溶解性があり、その結果、色素等のバルク液への溶出、拡散層へのバックフラッシュ、複数の試験部を有する多項目試験紙における色素等の隣接する試験部への付着等の不都合が生じる。また、乾燥に伴って色素等が試験部の縁へ移動して中央部の濃度が薄くなり周辺部の濃度が濃くなるといった現象も生じる。

【0009】測定の感度、正確さ、精度を低下させるこれらの不都合な現象は、特に試料液に浸漬して測定する尿試験紙等において顕著であるが、試料の種類にかかわらず一般的なことである。

【0010】これに対し、試験部にカバーを被せて試薬の溶出を防ぐ方法(特開平2-38861)、吸収性のよい多孔質構造体(多孔質層、多孔性膜など)からなる試験部に試料を均一に吸収させて隣接する試験部との液絡を防止する方法(特開平2-6541)、不溶性の色素を生成する反応を選択する方法、不溶性、疎水性のバインダー(固着剤)を利用して生成色素などを捕捉する方法(特開平7-181174)、多項目試験紙では隣接する試験部間の距離を広げる方法、浸漬時間を制御・調整する方法、拡散が起こる前に測定するよう時間を制

御する方法等が提案されている。

【0011】しかし、試験部にカバーを設けたり、沈殿凝固法などの処方で多孔質構造体を調製するのは、試験紙の製造工程が複雑になるという欠点がある。また、不溶性の色素などが生成する反応を選択すると、例えば酵素活性の生成物阻害が生じるなどの欠点がある。疎水性高分子をバインダーにした試験片では、水性試料溶液の吸収性が悪化するなどの欠点がある。また、多項目試験片では、通常一個のセンサーが複数の試験部を移動して反射光測定などを行っているので、試験部間の距離を広げると大面積が必要となったりセンサーの移動に不利となったりする欠点がある。その他、浸漬時間を制御する方法は尿試験では面倒であるという欠点があり、時間を制御する方法は反応時間との関係で容易ではないという欠点があるなど、それぞれに問題点があり、未だに満足のいく解決策は見い出されていないのが現状である。

【0012】また、電子伝達物質（メディエーター）と分析対象物質の間に酵素などによって酸化／還元反応を起こさせ、生じた電子伝達物質の酸化体／還元体を電極で還元／酸化するときの電気化学応答から分析対象物質の量を求める方法があり、重要な定量方法となっている。更に、特定のイオンと配位結合またはイオン結合をする配位子（イオノフォア）などが、液膜電極に用いられ、生成した錯体化合物の移動に伴う膜電位を測定することによって、分析対象物質であるイオンを定量する方法が知られており、やはり重要な定量法になっている。

【0013】このような電気化学的に検出できる電子伝達物質の酸化体／還元体または錯体化合物を用いる電極では、通常、不溶性のポリマー中に電子伝達物質または配位子を加えることによって、電子伝達物質または配位子の溶出や拡散の防止をはかり、同時に、速やかに電子移動が起きるように電極表面の近傍に電子伝達物質または配位子を保持させているが、ポリマー中の物質移動は制限を受けるため、試料中の分析対象物質または分析対象物質から生成する中間物質と、不溶性のポリマー中の電子伝達物質または配位子との反応が阻害されるという基本的な欠点があり、やはり満足のいく解決策は見い出されていないのである。

【0014】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、色素等の拡散・溶出を抑制し、正確な検査・分析を可能にし、且つ簡便に取り扱える分析用試験片を提供することを課題とする。

【0015】

【課題を解決するための手段】本発明者等は、試験片において、分析対象物質と試薬とが反応して生成する色素等を測定する領域である検出部に、特定の無機化合物を配合しておくことにより、色素等の拡散・溶出が抑制され、上記課題が解決されることを見出し、本発明を完成した。

【0016】すなわち、本発明は、試料中の分析対象物質と試薬とが反応して生成する検出可能な物質を測定することにより前記分析対象物質を測定するための分析用試験片であって、前記検出可能な物質を検出するための検出部を有する試験部を1以上備え、少なくとも前記検出部に層状無機化合物を含有する試験片に関する。

【0017】また、本発明は、前記検出部として検出可能な物質を検出するための検出層を含む、2以上の層からなる試験部を1以上備え、少なくとも前記検出層に層状無機化合物を含有する前記試験片に関する。

【0018】また、本発明は、前記試験部が、さらに試料を拡散するための拡散層を含み、試料が前記拡散層を通して拡散し前記検出層に到達するようにしたことを特徴とする前記試験片に関する。

【0019】また、本発明は、検出部として、検出可能な物質を検出するための検出領域を有する試験部を1以上備え、少なくとも前記検出領域に層状無機化合物を含有する前記試験片に関する。

【0020】また、本発明は、前記試験部が、さらに前記試料を拡散するための拡散領域を有し、試料が前記拡散領域を通して拡散し前記検出領域に到達するようにしたことを特徴とする前記試験片に関する。

【0021】また、本発明は、前記検出領域が、検出可能な物質を検出するための検出層を含む2以上の層からなる前記試験片に関する。また、本発明は、前記試験部がさらに試料中の分析対象物質と試薬とが反応するための反応部を有し、前記検出可能な物質が前記反応部で生成されるようにしたことを特徴とする前記試験片に関する。

【0022】また、本発明は、前記検出部が、試料が拡散して前記反応部を通過した後の位置に設けられていることを特徴とする前記試験片に関する。また、本発明は、前記検出可能な物質が、前記検出部において試料中の分析対象物質と試薬との反応により生成することを特徴とする前記試験片に関する。

【0023】本発明によれば、層状無機化合物を試験部に含めることにより、分析対象物と試薬との反応によって生成する色素等と前記層状無機化合物とが吸着すると考えられ、その結果、試料液や反応液等による拡散や溶出が抑制され、高感度かつ精度の高い分析が可能になる。

【0024】本発明の試験片は、液体中の成分を固相を用いて分析する方法に適用され、特に尿中のグルコース、ビリルビン等の分析に用いられる。このような液体中の成分の分析においては、試薬との反応で生成する色素等が試料液に溶解して拡散、溶出しやすく、本発明の試験片が有効である。

【0025】試薬としては、分析対象物質と検知しうる反応を起こすものであれば特に限定されないが、好ましくは分析対象物質と反応して色素化合物や電子伝達物質

の酸化体／還元体やイオノフォアとイオンの錯体化合物を生成しうるものである。尚、ここでいう色素化合物を生成する反応とは、光学的に検知しうるものが生成する反応であればよく、発色のみならず、例えば変色、蛍光、発光等をもたらすものであってもよい。また、生成する色素化合物等が水溶性の場合、試料液や反応液等によって拡散・溶出される場合が多いため、本発明はこのような水溶性色素化合物を生成する試薬を利用する試験片に適用するのが特に好ましい。

#### 【0026】

【発明の実施の形態】以下に、本発明の実施の形態を詳細に説明する。本発明の試験片は、試料中の分析対象物質と試薬とが反応して生成する検出可能な物質を測定することにより前記分析対象物質を測定するための分析用試験片であって、前記検出可能な物質を検出するための検出部を有する試験部を1以上備えたものである。

【0027】試験部は、試験片内において、試料液の吸収、拡散、反応、検出など一連の分析プロセスを担う機能的な部分であり、その構造は特に限定されないが、一般的には、前記反射率や透過吸収、蛍光などで色素等の検出可能な物質を検出するための検出部のほかに、試料液を吸入し試験部内に導入するための試験部の末端ないしはその近傍に設けられる試料吸入部、試料液を試験部内に均一に浸透・拡散させるための拡散浸透部、試料中に含まれる分析対象物質と反応する試薬を含む試薬部、検出反応などの反応がおきる反応部、試料中の成分や検出反応で生成する色素等をクロマトグラフィーと類似の作用で分離する展開部、試料液が移動する時間を利用して反応の進行を調整するための時間調整部、試料中の成分や生成する色素等を吸着作用でトラップし、又は除去するための保持部、過剰の試料液、添加された洗浄液や展開液を吸収し逆流を防止するための検出部に対し試料吸入部と反対側の試験部の末端又は近傍に設けられる吸収部等を備えている。

【0028】これら試験部の機能を担う各部は、各々相互に重複していてもよく、例えば検出部が試薬部と反応部とを兼ねたり、検出部が保持部を兼ねるなど、一つの部が複数の機能を兼ね備えていてもよい。

【0029】本発明の試験片の好ましい態様としては、例えば前記検出部として、検出可能な物質を検出する検出層を含む2以上の層からなる多層型試験部を1以上備えた試験片が挙げられる。検出層以外の層としては、試料液を吸入し試験部内に導入するための試料吸入層、試料液を試験部に均一に浸透・拡散させるための拡散層、試料中に含まれる分析対象物質と反応する試薬を含む試薬層、検出反応などの反応がおきる反応層、反応層と検出層の間などに設けられる妨害成分を除去するなどの作用を有する展開層ないしは保持層、過剰の試料液、添加された洗浄液や展開液を吸収し逆流を防止する吸収層、試験部を支持体上に固定させるための接着層等を設けるこ

とができる。特に好ましくは、前記検出層のほかに、さらに試料を拡散するための拡散層を含み、試料が前記拡散層を通して拡散し前記検出層に到達するようにした前記試験片が挙げられる。多層型試験部を有する試験片の例を後述する実施例4に示す。

【0030】また、別の好ましい態様としては、例えば前記検出部として前記検出可能な物質を検出するための検出領域を有する試験部を1以上備えた試験片が挙げられる。前記検出領域以外の領域としては、試料液を吸入し試験部内に導入するための試料吸入領域、試料液を試験部に均一に浸透・拡散させるための拡散領域、試料中に含まれる分析対象物質と反応する試薬を含む試薬領域、検出反応などの反応がおきる反応領域、試料中の成分や検出反応で生成する色素等を吸着や分配などのクロマトグラフィー類似の作用で分離する展開領域、試料液が移動する時間を利用して反応の進行を調整するための時間調整領域、試料中の成分や生成する色素等を吸着作用でトラップし、又は除去するための保持領域、過剰の試料液、添加された洗浄液や展開液を吸収し逆流を防止する吸収領域等を試験片上に設けることができる。特に好ましくは、前記検出領域のほかに、さらに試料を拡散するための拡散領域を含み、試験片の末端等に点着された試料が前記拡散領域を通して、毛細管浸透作用で主として平面的に試験片上を移動し前記検出領域に到達できるようにしたもの挙げられる。また、この場合、前記検出領域が、検出可能な物質を検出するための検出層を含む2以上の層からなる上述した多層構造を有するものであってもよい。このような試料液等の平面的な移動を利用した試験片の例を後述する実施例5に示す。

【0031】本発明においては、試料中の分析対象物質と試薬とが反応するための反応部を前記検出部とは別に設け、前記検出可能な物質が前記反応部で生成された後、前記検出部に導入され検出されるようにしたものであってもよい。その場合、前記検出部は、試料が拡散して前記反応部を通過した後の位置に設けられるのが好ましい。具体的には、多層型試験部の表面から浸透した試料が拡散層を通して拡散して中間層の反応層に移動し、さらに前記反応層を通過した後に到達する位置に検出層を設けるのが好ましい。また、試験片上に検出領域、反応領域及び拡散領域を設け、前記試料が主として平面的に移動して拡散領域を通して浸透して反応領域に移動し、さらに前記反応領域を通過した後に到達する領域に検出領域を設けるのが好ましい。

【0032】また、本発明においては、前記検出部が同時に試料中の分析対象物質と試薬とが反応するための反応部をも兼ねるようにし、前記検出可能な物質が、前記検出部において試料中の分析対象物質と試薬との反応により生成するようにしてもよい。

【0033】本発明の検出部は、分析対象物質と試薬との反応によって生成した色素等の検出可能な物質が実際

に検出される部分であるが、上述したように前記反応が起こる反応部や試薬が含まれる試薬部などを兼ねている場合があり、その場合は通常検出部にあらかじめ試薬が含まれている。一方、本発明においては、前記反応部や試薬部とは別の独立した検出部を有するものであってもよいから、その場合は、必ずしも最初に試薬が試験部に含まれていなくてもよく、試料を添加する前及び／又は添加した後に試薬を添加するような形式であってもよい。また、分析対象物質と試薬との反応によって生成した色素等の検出可能な物質の溶液を添加する形式であってもよい。

【0034】本発明の試験片は、通常このような試験部と、試験部を支持するシート状、管状、棒状等の支持部とからなり、さらに必要に応じ電極等のセンサー、試料液吸入装置等が付随していてもよい。

【0035】本発明は、以下に述べるような色素等の検出可能な物質を生成しうる試薬及び反応系を利用した試験片に適用するのが好ましい。試薬としては、反応によって生成した色素等の検出可能な物質が、本発明の層状無機化合物と吸着など相互作用を生じて複合体を形成しうるものであれば特に限定されない。層状無機化合物に吸着可能な物質は、例えば、H. Van Olphen著の成書「An Introduction to Clay Colloid Chemistry, Second Edition」(Krieger Publishment, Malabar)の11章「Interaction of Clays and Organic Compounds」などに詳述されている。また、特公昭50-8462(加藤忠義)などには、多数の吸着可能な化合物が紹介されている。

【0036】層状無機化合物に吸着等する検出可能な物質を生成する試薬は、酸化還元反応、酸塩基反応、縮合反応、錯体形成反応などにより色素、蛍光色素等の光学的に検出可能な物質を生成する色素前駆体等の化合物や、電気化学的に検出可能なメディエーター(電子伝達物質)の酸化体/還元体または錯体化合物を生成する化合物などにおいて幅広く見出すことができる。

【0037】試料、試薬又は反応物は、水を溶媒とする溶液であることが多いので、前述の検出可能な物質が水溶性であれば拡散・溶出されやすい。したがって、検出可能な物質が水溶性であるとき本発明の効果が特によく現れる。よって、用いる試薬は水溶性の検出化合物を生成する試薬であることが好ましく、実際にそのような試薬は数多く利用されている。しかし、これに限定されず、試料、試薬又は反応物が水以外の溶媒によるものであってもよく、その場合、用いる試薬はその溶媒によって拡散・溶出される検出可能な物質を生成するものであっても差し支えない。もちろん、試料、試薬又は反応物の溶媒に不溶性の検出可能な物質を生成する試薬を用いてもかまわない。

【0038】以下に、光学的に検出可能な物質を生成する試薬について具体的に説明する。色素前駆体としては、好ましくは芳香環等の共役系を有する化合物が用い

られ、具体的には、4-アミノ-1, 2-ジヒドロ-1, 5-ジメチル-2-フェニル-3H-ピラゾール-3-オンに代表されるカップラーと、水素供与体(N-エチル-N-(3-スルホプロピル)-3, 5-ジメチルアニリンなど)の試薬類(酸化縮合することによってキノン系色素を生成する)、オルトトリジン、ベンジジン類(3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジンなど)などの酸化発色体色素を生成する色素前駆体、2, 6-ジクロロ-4-[(4-ヒドロキシフェニル)イミノ]-2, 5-シクロヘキサジエン-1-オンなどの色素のロイコ体(酸化されることによって発色する)、4-ヒドロキシフェニル酢酸などの酸化されて蛍光物質を生成する化合物、化学発光物質など発光物質、テトラゾリウム塩(還元されてホルマゼンを生成する)、1, 1'-ジメチル-4, 4'-ビピリジリウム塩などの還元されて色素を生成する試薬類、プロモクレゾールグリーンなどpHの変化によって発色または変色する化合物、2-メトキシ-4-モルホリノベンゼンジアゾニウム塩などのジアゾニウム塩(カップリングによってアゾ系色素を生成する)、2, 3-ジメチル-2, 3-ビス(ヒドロキシアミノ)ブタン(アルデヒドと反応して呈色する)など種々の公知の呈色反応用試薬、オルトフタルアルデヒド(ヒスタミンと反応して蛍光物質を生成する)など種々の公知の反応用試薬、4-メチルウンベリフェリルリン酸塩などの酵素基質、2-(5-プロモ-2-ビリジルアゾ)-5-[N-プロピル-N-(3-スルホプロピル)アミノ]アニリン塩などの錯体を形成し発色・変色する化合物等が挙げられる。

【0039】ここで、水素供与体とは、過酸化水素の共存下、ペルオキシダーゼ作用で、4-アミノ-1, 2-ジヒドロ-1, 5-ジメチル-2-フェニル-3H-ピラゾール-3-オン(以下、4-AAと略す。)や3-メチル-2-ベンゾチアゾリノンヒドラゾンと縮合してキノン系色素を生成するフェノール等の化合物であり、具体的にはジクロロフェノール、オルトメトキシフェノール、1, 2, 3-トリヒドロキシベンゼン、ジメチルアニリン、N-エチル-N-スルホプロピルメタアニシジン、N-エチル-N-スルホプロピルアニリン、N-エチル-N-(3-スルホプロピル)-3, 5-ジメチルアニリン、N-エチル-N-スルホプロピルメタトルイジン、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)メタアニシジン、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)アニリン、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3, 5-ジメトキシアニリン、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3, 5-ジメチルアニリン、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロ

ロピル)メタトルイジン、N-(3-スルホプロピル)アニリン等が挙げられる。

【0040】またオルトリジン、ベンジジン類としては、オルトリジン、ジアニシジン、3,3'-ジアミノベンジジン、3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン、N-(3-スルホプロピル)-3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン等が挙げられる。

【0041】またロイコ体とは酸化されて色素となり発色する無色の色素前駆体である。ロイコ体が酸化された色素としては、2,6-ジクロロ-4-[(4-ヒドロキシフェニル)イミノ]-2,5-シクロヘキサジエン-1-オン、2,6-ジクロロ-4-[(3-クロロ-4-ヒドロキシフェニル)イミノ]-2,5-シクロヘキサジエン-1-オン、7-(ジエチルアミノ)-3-イミノ-8-メチル-3H-フェノキサジン塩、3-(ジエチルアミノ)-7-アミノ-5-フェニルフェナジニウム塩、3,7-ビス(ジメチルアミノ)フェノチアジン-5-イウム塩、1-ヒドロキシ-5-メチルフェナジニウム塩、7-ヒドロキシ-3H-フェノキサジン-3-オン-10-オキシドが挙げられ、ロイコ体としては、4,4'-ベンジリデンビス(N,N-ジメチルアニリン)、4,4'-ビス[N-エチル-N-(3-スルホプロピルアミノ)-2,6-ジメチルフェニル]メタン、1-(エチルアミノチオカルボニル)-2-(3,5-ジメトキシ-4-ヒドロキシフェニル)-4,5-ビス(4-ジエチルアミノフェニル)イミダゾール、4,4'-ビス(ジメチルアミノ)ジフェニルアミン、N-(カルボキシメチルアミノカルボニル)-4,4'-ビス(ジメチルアミノ)ジフェニルアミン塩、10-(カルボキシメチルアミノカルボニル)-3,7-ビス(ジメチルアミノ)フェノチアジン塩等が挙げられる。

【0042】酸化されて発色する色素前駆体としては、そのほかに、4-メトキシフェノール、4-エトキシフェノール、2-エトキシフェノール、1-(2-ヒドロキシ-5-メトキシフェニル)エタノン、2-ヒドロキシ-5-メトキシ安息香酸、2-ヒドロキシ-5-メトキシベンズアルデヒド、2-ヒドロキシ-5-メトキシ安息香酸メチル、4-メトキシ-2-ニトロフェノール、2-クロロ-4-メトキシフェノール、4-ヒドロキシ-3-メトキシベンズアルデヒド、4-ヒドロキシ-3-メトキシ安息香酸などが挙げられる。

【0043】また、3-(4-ヒドロキシフェニル)-2-プロペン酸、2-ヒドロキシフェニル酢酸、3-ヒドロキシフェニル酢酸、4-ヒドロキシフェニル酢酸、3-ヒドロキシ安息香酸、4-ヒドロキシ安息香酸、2-アミノ安息香酸、3-アミノ安息香酸、4-アミノ安息香酸、3,4-ジアミノ安息香酸、3,5-ジアミノ安息香酸、4-アミノ-2-クロロ安息香酸、4-アミノ-3-メチル安息香酸、4-アミノ-3-メトキシ安

息香酸、4-アミノフタル酸などが挙げられる。

【0044】また、2,4-ジアミノ-6-ヒドロキシピリミジン、4,5-ジアミノ-6-ヒドロキシピリミジン、4-アミノ-2,6-ジヒドロキシピリミジン、6-ヒドロキシ-2,4,5-トリアミノピリミジン、4,5-ジアミノ-2,6-ジヒドロキシピリミジン、4-アミノ-6-ヒドロキシ-2-メチルピリミジン、4-アミノ-6-ヒドロキシピリミジン、4-アミノ-6-ヒドロキシ-2-メトキシピリミジンなどが挙げられる。

【0045】また酸化されて蛍光物質を生成する試薬類としては、4-ヒドロキシフェニル酢酸、(4-ヒドロキシ-3-メトキシフェニル)酢酸、3-(4-ヒドロキシフェニル)プロピオン酸、4-ヒドロキシ-(2-アミノエチル)フェノール、4-ヒドロキシ-N,N,N-トリメチルベンゼンメタミニウム、アルファミノパラヒドロキシヒドロキイ皮酸、4-ヒドロキシフェネチルアミン、N-(4-ヒドロキシフェニル)アセトアニリド、2,7-ジクロロフルオレセインジアセテート等が挙げられる。

【0046】また化学発光物質など発光物質としては、ホタルルシフェリン、ウミホタルルシフェリン、エクオリン、ルシゲニン誘導体、ルミノール誘導体、アクリジニウムエステル、過シュウ酸エステル等が挙げられる。

【0047】例えば前記4-AAと水素供与体、ベンジジン類、ロイコ体が過酸化水素など酸化性物質の存在下で酸化反応して発色する反応系を利用する方法では、生成する色素を吸光光度計などで測定して間接的に過酸化水素を定量することによって分析対象物質を定量するのである。

【0048】また前記蛍光物質や発光物質が生成する反応系を利用する方法では、蛍光光度計や発光光度計などで測定して間接的に過酸化水素を定量することによって分析対象物質を定量するのである。

【0049】このような色素を生成する酸化反応において、酸化反応に与る酸化剤は過酸化水素に限定されるものではなく、種々の公知の酸化剤を利用してもよい。ペルオキシダーゼなどの酸化酵素を添加してもよい。また色素が生成する酸化反応に先立って、前記酸化剤が生成する反応が生じていてもよい。

【0050】またテトラゾリウム塩としては、2,3,5-トリフェニルテトラゾリウム塩、2,5-ジフェニル-3-(1-ナフチル)-2H-テトラゾリウム塩、3,3'-[3,3'-ジメトキシ-(1,1'-ビフェニル)-4,4'-ジイル]-ビス[2-(4-ニトロフェニル)-5-フェニル-2H-テトラゾリウム]塩、3,3'-[3,3'-ジメトキシ-(1,1'-ビフェニル)-4,4'-ジイル]-ビス(2,5-ジフェニル-2H-テトラゾリウム)塩、2-(4-ヨードフェニル)-3-(4-ニトロフェニル)-5-フェ

ニル-2H-テトラゾリウム塩、2-(4-ヨードフェニル)-3-(4-ニトロフェニル)-5-(2,4-ジスルホフェニル)-2H-テトラゾリウム塩、2-(4-ヨードフェニル)-3-(2,4-ジニトロフェニル)-5-(2,4-ジスルホフェニル)-2H-テトラゾリウム塩、3,3'-(1,1'-ビフェニル-4,4'-ジイル)-ビス(2,5-ジフェニル-2H-テトラゾリウム)塩、3-(4,5-ジメチル-2-チアゾリル)-2,5-ジフェニル-2H-テトラゾリウム塩等が挙げられる。

【0051】また還元されて色素を生成する化合物としては、1,1'-ジメチル-4,4'-ビピリジリウム塩、1,1'-ジベンジル-4,4'-ビピリジリウム塩等の還元体が挙げられる。また7-ヒドロキシ-3H-フェノキサジン-3-オン-10-オキシドなどが還元されて蛍光色素を生成するが、このような蛍光色素を生成する試薬としては、7-ヒドロキシ-3H-フェノキサジン-3-オン-10-オキシド、5-シアノ-2,3-ビス(4-メチルフェニル)-2H-テトラゾリウム塩、2,3-ビス(4-シアノフェニル)-5-シアノ-2H-テトラゾリウム塩等が還元されて生成する蛍光物質等が挙げられる。

【0052】例えば前記テトラゾリウム塩などが還元剤の存在下で還元反応して発色する反応系を利用する方法では、生成する色素を吸光度計又は蛍光度計などで測定して間接的に還元剤を定量することによって分析対象物質を定量するのである。また色素が生成する還元反応に先立って還元剤が生成する反応が生じていてもよい。

【0053】このような色素を生成する還元反応において、還元反応に与る還元剤としてニコチンアミダデニンジヌクレオチドもしくはニコチンアミダデニンジヌクレオチドホスフェートが好ましく用いられる。しかしもちろんこれに限定されるものではなく、種々の公知の還元剤を利用していてもよい。

【0054】またpHの変化によって発色または変色する化合物としては、プロモクレゾールグリーン、プロモフェノールブルー、フェノールレッド、プロモピロガロールレッド、ピロガロールレッドなどのスルホンフタレイ系色素、マラカイトグリーン、ロゾリックアシドなどのトリフェニルメタン系色素、キナルジンレッド、N-(パラヒドロキシフェニル)-2,6-ジクロロパラベンゾキノニンイミンなどのキノリン系色素、7-ヒドロキシ-3H-フェノキサジン-3-オン-10-オキシドなどのオキサゾン系色素、6,7-ジヒドロキシ-4-メチルクマリンなどのクマリン系色素、アニリンオリゴマーなどの導電性高分子化合物が挙げられる。

【0055】例えばpHの変化によって発色または変色する化合物が酸または塩基によって発色または変色する反応系を利用する方法では、生成する色素を吸光度計

などで測定して間接的に酸または塩基を定量することによって分析対象物質を定量するのである。

【0056】また例えばpHの変化によって発色または変色する化合物が水素イオンによって発色または変色する反応系を利用する方法では、生成する色素を吸光度計などで測定して水素イオン濃度を定量することによって分析対象物質を定量するのである。

【0057】またジアゾニウム塩としては、インドキシルとカップリングしてアゾ系色素を生成する2-メトキシ-4-モルホリノベンゼンジアゾニウム塩、ウロビリノーゲンとカップリングしてアゾ系色素を生成する3,3'-ジメトキシビフェニル-4,4'-ジアゾニウム塩などが挙げられる。またこの範疇にある試薬としては、ジアゾニウム塩を生成する反応に与る試薬がある。そのような試薬としては、亜硝酸塩の存在下にジアゾニウム塩を生成する4-アミノベンゼンアルソン酸やそのジアゾニウム塩とカップリングしてアゾ系色素を生成するN-1-ナフチルエチレンジアミンが挙げられる。また亜硝酸塩の存在下にカップリングしてアゾ系色素を生成する2,4-ジクロロアニリン、N,N-ジエチル-N'-1-ナフチルナフチルエチレンジアミンシュウ酸塩(津田試薬)が挙げられる。また、亜硝酸塩が挙げられる。

【0058】前記アゾ系色素が生成する反応系を利用する方法では、生成する色素を吸光度計などで測定して反応の出発物質である分析対象物質(前記の例ではインドキシル、ウロビリノーゲン、亜硝酸塩である)を定量するのである。アゾ系色素が生成する反応は、もちろん前記の例に限定されるものではなく、種々の公知のアゾ系色素が生成する反応に好ましく適用される。

【0059】また種々の公知の呈色反応用試薬としては、アルデヒドを検出するときの過酸化水素と1,4-ジアミノベンゼン、アルデヒドを検出するときの2,3-ジメチル-2,3-ビス(ヒドロキシアミノ)ブタン、アルデヒドを検出するときの3-メチル-2-ベンゾチアゾリノンヒドラゾンと酸化剤、二級アミンを検出するときの10H-フェノチアジンと臭素、チオールを検出するときの2,2'-ジチオジピリジンなどが挙げられるが、もちろんこれに限定されるものではない。前記公知の呈色反応を利用する方法では、生成する色素を吸光度計などで測定して反応の出発物質である分析対象物質(前記の例ではアルデヒド、二級アミン、チオールである)を定量するのである。利用できる公知の呈色反応は、もちろん前記の例に限定されるものではない。

【0060】また蛍光物質を生成する種々の公知の反応用試薬としては、グアニジノ化合物を検出するときの2-ヒドロキシ-1,2-ジフェニルエタノン、ヒスタミンを検出するときのオルトフタルアルデヒド、スベルミジンを検出するときのオルトフタルアルデヒド、アルファケト酸を検出するときの1,2-ジアミノ-4,5-



ジメトキシベンゼンなどが挙げられるが、もちろんこれに限定されるものではない。

【0061】前記公知の検出反応を利用する方法では、生成する蛍光物質を蛍光光度計などで測定して反応の発現物質である分析対象物質（前記の例ではグアニジノ化合物、ヒスタミン、スベルミジン、アルファクト酸である）を定量するのである。利用できる公知の検出反応は、もちろん前記の例に限定されるものではない。

【0062】また酵素によって反応し色素や蛍光物質を生成する酵素基質としては、キモトリプシンの基質であるN-トシル-L-フェニルアラニン-2-アミドアクリドン、アミノペプチダーゼの基質であるL-アラニン-2-アミドアクリドン、エステラーゼを測定するときの7-アセトキシ-N-メチルキノリニウム塩、エステラーゼの基質である7-アセトキシ-3H-フェノキサジン-3-オン、ホスファターゼの基質である4-メチルウンベリフェリリン酸塩、ホスファターゼの基質である5, 10, 15, 20-テトラキス(4-ホスホオキシフェニル)ポルフィンなどが挙げられるが、もちろんこれに限定されるものではない。

【0063】例えば前記酵素基質が酵素によって分解される反応を利用する方法では、生成する色素や蛍光物質を吸光光度計や蛍光光度計などで測定して間接的に酵素を定量することによって分析対象物質を定量するのである。酵素や酵素基質は例えば抗体やその断片に化学的に結合していてもよい。

【0064】また錯体を形成し発色・変色する化合物とは、金属イオンやアニオンと、配位結合やイオン結合で錯体を形成し、色素あるいは蛍光物質を生成する配位子などの化合物である。金属イオンと錯体を形成し発色・変色する化合物としては、金属指示薬やクロモイオノフォアとして知られている化合物のほか、有色の遷移金属イオンと錯体を形成して着色する化合物が含まれるが、具体的にはエチレンジアミン四酢酸、2, 2-ビピリジン、1-ヒドロキシ-2-(2-ヒドロキシフェニルアゾ)ベンゼン、ジベンゾ-18-クラウン-6、ジシクロヘキシル-18-クラウン-6、環状ポリアミン類、カリックス[4]アレール、3-[N, N-ビス(カルボキシメチル)アミノメチル]-1, 2-ジヒドロキシアンスラキノ、5', 5"-ジブプロモピロガロールスルホンフタレイン、2-ヒドロキシ-1-(1-ヒドロキシ-2-ナフチルアゾ)-6-ニトロ-4-ナフタレンスルホン酸塩、2, 6-ジクロロ-4'-ヒドロキシ-3', 3"-ジメチルフクソン-5', 5"-ニカルボン酸塩、3, 3'-ビス[N, N-ビス(カルボキシメチル)アミノメチル]フルオレッセイン、8-[N, N-ビス(カルボキシメチル)アミノメチル]-4-メチルウンベリフェロン、2, 7-ビス(2-アルソノフェニルアゾ)-1, 8-ジヒドロキシ-3, 6-ナフタレンジスルホン酸、5-クロロ-2-ヒドロキシ-3-

(2, 4-ジヒドロキシフェニルアゾ)ベンゼンスルホン酸、5-[ (ヘキサヒドロ-2, 4, 6-トリオキソ-5-ピリミジニル) イミノ]-2, 4, 6(1H, 3H, 5H)-ピリミジントリオン塩、2-(5-ブプロモ-2-ピリジルアゾ)-5-[N-プロピル-N-(3-スルホプロピル)アミノ]アニリン塩、1, 8-ジヒドロキシ-2-(2-ピリジルアゾ)-3, 6-ナフタレンジスルホン酸塩、2-ニトロソ-5-[N-プロピル-N-(3-スルホプロピル)アミノ]フェノール等が挙げられる。

【0065】また特に一価のカチオンと有色錯体を生成する化合物としては、テトラキス[3, 5-ビス(トリフルオロメチル)フェニル]ボレート塩、テトラフェニルホスホニウム塩等が挙げられる。

【0066】また特にカルシウムイオンなどと蛍光錯体を生成する化合物としては、1-[2-アミノ-5-(2, 7-ジクロロ-6-ヒドロキシ-3-オキシ-9-キサンテニル)フェノキシ]-2-(2-アミノ-5-メチルフェノキシ)エタン-N, N, N', N'-四酢酸塩、1-[2-アミノ-5-(2, 7-ジクロロ-6-ヒドロキシ-3-オキシ-9-キサンテニル)フェノキシ]-2-(2-アミノ-5-メチルフェノキシ)エタン-N, N, N', N'-四酢酸 ペンタアセトキシメチルエステル、1-[6-アミノ-2-(5-カルボキシ-2-オギザゾイル)-5-ベンゾフラニロキシ]-2-(2-アミノ-5-メチルフェノキシ)エタン-N, N, N', N'-四酢酸塩、1-[6-アミノ-2-(5-カルボキシ-2-オギザゾイル)-5-ベンゾフラニロキシ]-2-(2-アミノ-5-メチルフェノキシ)エタン-N, N, N', N'-四酢酸 ペンタアセトキシメチルエステル、1-[2-アミノ-5-(6-カルボキシ-2-インドリル)フェノキシ]-2-(2-アミノ-5-メチルフェノキシ)エタン-N, N, N', N'-四酢酸塩、1-[2-アミノ-5-(6-カルボキシ-2-インドリル)フェノキシ]-2-(2-アミノ-5-メチルフェノキシ)エタン-N, N, N', N'-四酢酸 ペンタアセトキシメチルエステル、8-アミノ-2-[(2-アミノ-5-メチルフェノキシ)メチル]-6-メトキシキノリン-N, N, N', N'-四酢酸塩、8-アミノ-2-[(2-アミノ-5-メチルフェノキシ)メチル]-6-メトキシキノリン-N, N, N', N'-四酢酸 ペンタアセトキシメチルエステル、3, 3'-ビス[N, N-ビス(カルボキシメチル)アミノメチル]フルオレッセイン、8-[N, N-ビス(カルボキシメチル)アミノメチル]-4-メチルウンベリフェロンなどが挙げられる。

【0067】またアニオンと有色錯体を形成するテトラフェニルアルソニウム塩、塩化物イオンと錯体を形成すると蛍光強度が減少する臭化N-エトキシカルボニルメチル-6-メトキシキノリニウム、ホウ素と錯体を形成

する8-ヒドロキシ-1-(サリシリデンアミノ)-3,6-ナフタレンジスルホン酸塩などが挙げられる。

【0068】前記錯体が形成される反応を利用する方法では、イオンと配位子などが生成する色素や蛍光物質を吸光光度計や蛍光光度計などで測定して色素や蛍光物質の量を定量することによって分析対象物質(多くの場合、イオンである)を定量するのである。

【0069】以上、光学的に検出可能な物質について述べたが、次に電気化学的に検出可能な物質を生成する試薬について説明する。電気化学的方法によって検出できる電子伝達物質の酸化体/還元体または錯体化合物を生成する試薬とは、電子伝達物質(メディエーター)の還元体/酸化体または特定のイオンと配位結合またはイオン結合によって錯体を形成する配位子(イオノフォア)などである。

【0070】電子伝達物質とは、分析対象物質を酵素などによって酸化/還元し、その際分析対象物質から、または分析対象物質に、直接的に電子を受容/供与する化学物質であって、電子伝達物質の還元体/酸化体を電極で酸化/還元するときの電気化学応答から分析対象物質を定量するのである。また、電子伝達物質と分析対象物質が直接的に電子を授受してなくても良く、電子伝達物質は、分析対象物質を酵素などによって酸化/還元し、その際分析対象物質から、または分析対象物質に間接的に電子を受容/供与する化学物質であっても良い。分析対象物質と定量的関係にある電子伝達物質の酸化体/還元体を電極で還元/酸化するときの電気化学応答から分析対象物質を定量するのである。

【0071】電子伝達物質としては、用いる電極の測定可能範囲内の電位(カーボン電極では通常-1.2V~+1.0V)で酸化還元されるものが好ましく、具体的には、1,1'-ジメチル-4,4'-ビピリジリウム塩、1,1'-ジベンジル-4,4'-ビピリジリウム塩、1,4-ジアミノベンゼン、2-メチル-1,4-ナフトキノ、N-メチルフェナジニウム塩、1-ヒドロキシ-5-メチルフェナジニウム塩、1-メトキシ-5-メチルフェナジニウム塩、9-ジメチルアミノベンゾアルファフェノキサジン-7-イウム塩、フェロセン誘導体、ヘキサシアノ鉄(II)塩、7-ヒドロキシ-3H-フェノキサジン-3-オン、10-オキシド、3,7-ジアミノ-5-フェニルフェナジニウム塩、3-(ジエチルアミノ)-7-アミノ-5-フェニルフェナジニウム塩、1,4-ベンゼンジオール、1,4-ジヒドロキシ-2,3,5-トリメチルベンゼン、N,N,N',N'-テトラメチル-1,4-ベンゼンジアミン、Δ2,2'-ビー-1,3-ジチオール、2,6-ジメチルベンゾキノ、2,5-ジメチルベンゾキノ、2,3,5,6-テトラメチル-2,5-シクロヘキサジェン-1,4-ジオン、2,6-ジクロロ-4-[ (4-ヒドロキシフェニル) イミノ ]-2,5-シク

ロヘキサジェン-1-オン、2,6-ジクロロ-4-[ (3-クロロ-4-ヒドロキシフェニル) イミノ ]-2,5-シクロヘキサジェン-1-オン、7-(ジエチルアミノ)-3-イミノ-8-メチル-3H-フェノキサジン塩、3,7-ビス(ジメチルアミノ)フェノチアジン-5-イウム塩等が挙げられる。

【0072】この例において、電子伝達物質の還元体/酸化体が電気化学的に検出可能な物質を生成する試薬であって電気化学的に検出可能な物質を生成する反応とは、電子伝達物質の酸化/還元反応である。前述のように分析対象物質と定量的関係をもって存在する電子伝達物質の酸化体/還元体を電極で還元/酸化するときの酸化還元電流などの電気化学応答を測定し、分析対象物質を定量するのである。

【0073】イオノフォアとは、分析対象物質である特定のイオンと選択的に配位結合またはイオン結合を生じ、錯体となる配位子などの化合物であって、液膜電極で用いられていることは特に良く知られている。

【0074】具体的には、カチオンと錯体をつくるイオノフォアとして、テトラキス[3,5-ビス(トリフルオロメチル)フェニル]ボレート塩、テトラフェニルホスホニウム塩、バリノマイシン、シクロ(N',N'-ジオクチル-D-アスパラギニル-L-プロリル-L-アラニル)<sub>2</sub>、ビス(ベンゾ-15-クラウン-5)、ビス[(ベンゾ-15-クラウン-5)-4-メチル]ビメレート、ビス(12-クラウン-4)、ビス[(12-クラウン-4)メチル]-2-ドデシル-2-メチルマロネート、14-クラウン-4、ドデシル-メチル-14-クラウン-4、6,6-ジベンジル-1,4,8,11-テトラオキサシクロテトラデカン、ジベンゾ-18-クラウン-6、ジシクロヘキシル-18-クラウン-6、4,16-ジ-N-オクタデシルカルバモイル-3-オキサブチリル-1,7,10,13,19-ペンタオキサ-4,16-ジアザシクロヘンイコサン等が挙げられる。

【0075】またアニオンと錯体をつくるイオノフォアとして、テトラフェニルアルソニウム塩、6-メトキシ-N-(3-スルホプロピル)キノリニウム塩などが挙げられる。

【0076】液膜電極とは、電極の表面に多孔質の高分子層などを設け、高分子層にイオノフォアを染み込ませ、試料液中の特定のイオンのみと結合させて高分子層内を移動させることによって、ある特定のイオンのみを選択分離させ、その際に生じる膜電位を測定し分析対象物質である特定のイオンを定量する方法である。もちろん電気化学的検出方法にイオノフォアが用いられるのは、この液膜電極の例に限られるわけではない。

【0077】この例において電気化学的に検出可能な物質を生成する試薬とは特定のイオンと錯体を形成するイオノフォアであり、検出可能な物質を生成する反応とは

配位結合またはイオン結合によるイオノフォアと特定のイオンとの錯体形成反応である。前述のように分析対象物質である特定のイオンの濃度に応じて発生する膜電位を電気化学的に測定することにより、分析対象物質を定量するのである。

【0078】このような検出可能な物質を生成する反応系としては、具体的には以下のような反応系が挙げられる。

【0079】(a)過酸化水素の生成反応または過酸化水素を酸化剤とする酸化反応を含む反応系を利用する方法であり、具体的には、分析対象物質から酸化酵素反応系を介して過酸化水素を生成させ、これをペルオキシダーゼの共存下、被酸化性発色体（色素前駆体）と酸化還元反応を行わせて、この反応により生成する色素化合物を比色定量する分析対象物質の分析方法。

【0080】(b)ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド（NADH）もしくはニコチンアミドアデニンジヌクレオチドホスフェート（NADPH）を生成する反応、または、NADHもしくはNADPHを還元剤として使用する反応を含む反応系を利用する方法であって、具体的には、例えば、分析対象物質から、脱水素酵素反応系を介してNADHまたはNADPHを生成させ、これを電子伝達系存在下に色素前駆体に作用させて還元し、これにより生成する色素化合物を比色定量する分析方法。

【0081】(c)酸性下で芳香族第1アミンに亜硝酸を反応させてジアゾニウム塩を生成させ、生成したジアゾニウム塩と被カップリング試薬とを反応させ、次いで生成したアゾ色素を定量する亜硝酸塩、ジアゾニウム塩、カップリング化合物の量を測定する方法。

【0082】(d)リン酸エステルを有する4-メチルウンベリフェロンなどの蛍光酵素基質が、アルカリホスファターゼの作用によってリン酸塩を遊離して蛍光物質を生成し、生成した蛍光物質に励起光を照射し発する蛍光を測定する、蛍光酵素基質で標識された物質やアルカリホスファターゼの量を測定する方法。

【0083】(e)酸化還元酵素などによって1, 4-ジアミノベンゼンなどのメディエーターを酸化/還元し、生成したメディエーターの酸化体/還元体が電極反応で還元/酸化されるときに電流応答を測定する、酸化還元酵素や酸化還元酵素で標識された物質の量の測定方法。

【0084】このような反応系を利用した分析方法としては、ELISA等のイムノアッセイ、イムノクロマト、尿検査、生化学血液検査、比色試験紙等が挙げられる。このような試験片の具体的な例は、H. G. Curme, et al., *Clinical Chemistry*, 24(8), 1335-1342(1978)、B. Walter, *Analytical Chemistry*, 55(4), 498A(1983)、近藤朝士「ぶんせき」1984(7), 534、近藤朝士「ぶんせき」1986(6), 387、分析化学便覧第8頁（日本分析化学会編：改訂4版、丸善(1991)）、特開平6-213886（北島昌夫ら）、M. P. Allen, et al., *Clinical Ch*

*emistry*, 36(9), 1591-1597(1990)、D. Noble, *Analytical Chemistry*, 65(23), 1037A(1993)、R. F. Zuk, et al., *Clinical Chemistry*, 31(7), 1144-1150(1985)等の文献に詳述されている。これらの方法で分析できる物質としては、体液中の尿や血液等の生体成分、食品、医薬、自然環境に存在する微量物質、産業化学物質、廃棄物中の微量物質等が挙げられ、本発明の試験片はこれらの分析に利用することができる。

【0085】本発明の試験片の試験部には、更に必要に応じてかかる分析用試験片に通常用いられる公知の配合物、例えば親水性ポリマー等を含有させることができる。

【0086】本発明においては、試験片における試験部のなかの、生成した色素が存在する部分である検出部に層状無機化合物が含まれていることが必要である。すなわち、前記試験部を構成する少なくとも1つの検出層又は検出領域に層状無機化合物が含まれていることが必要である。具体的には、検出層を含む2以上の層からなる多層型試験部においては、少なくとも前記検出層に層状無機化合物を含有する。この場合、さらに前記検出層以外の層に層状無機化合物を含有してもよく、例えば試料吸入層、拡散層、試薬層、反応層、接着層、保持層、展開層、吸収層等に層状無機化合物を含有してもよい。

【0087】また、前記試験部が検出領域を有する場合は、少なくとも前記検出領域に層状無機化合物を含有する。さらに前記検出領域以外の領域に層状無機化合物を含有していてもよく、例えば試料吸入領域、拡散領域、試薬領域、反応領域、展開領域、時間調整領域、保持領域、吸収領域等に層状無機化合物を含有してもよい。この場合、検出領域は多層構造であってもよく、その場合は検出領域を構成する層のうち少なくとも検出層に層状無機化合物を含む。また、さらに他の層に層状無機化合物が含有されていてもよい。

【0088】また、試験部が前記検出部のほかに、試料中の分析対象物質と試薬とが反応するための反応部を有する場合は、試料が拡散して前記反応部を通過した後の位置に検出部を設け、該反応部において生成された検出可能な物質が層状無機化合物を含有する検出部に移動して検出されるようにするのが好ましい。

【0089】本発明の層状無機化合物は、Si四面体、Al八面体等の多面体が平面状に連なったシート構造が層状に重なった結晶構造を有する無機化合物であり、層状粘土鉱物及びハイドロタルサイトが含まれる。

【0090】粘土鉱物とは、粘土（細かい土状の無機粒状物で、水で湿った状態で可塑性のあるもの）の大半を占めるアルミニウムケイ酸塩鉱物をいい、通常は、Siが4つのO（酸素原子）に囲まれたSi四面体とAl又はMgが6つのOH基あるいはOに囲まれたAl（又はMg）八面体を最小構成単位としている。

【0091】層状粘土鉱物の構造は、Si四面体が1つ

の面を共有し、残る頂点のOを同方向に向けて六角網状のシートを形成し(四面体シート)、一方Al(又はMg)八面体が稜角を共有してシートを形成し(八面体シート)、これらが層状に重なったものである。四面体シートと八面体シートが一枚づつ重なってできた1:1層が何枚も積み重なってできた鉱物を1:1型鉱物、一枚の八面体シートを2枚の四面体シートで挟んだ2:1層が何枚も積み重なってできた鉱物を2:1型鉱物、2:1型の層間にもう一枚八面体シートが挟まったものを2:1:1型鉱物という。また、八面体シートがMg(OH)<sub>2</sub>ですべての八面体位置に金属イオンが存在するものを3八面体型(Trioctahedral)、八面体シートがAl(OH)<sub>3</sub>で1/3が空孔になっているものを2八面体型(Dioctahedral)という。本発明で用いる層状無機化合物としては、2:1型鉱物が好ましい。

【0092】本発明の層状無機化合物を構成する元素は、好ましくは、リチウム、ナトリウム、カリウム、マグネシウム、アルミニウム、ケイ素、酸素、水素、フッ素、及び炭素から選ばれる少なくとも一つ以上から構成され、具体的には以下に示す式1~9のいずれか一つで表される化合物が挙げられる。尚、これらの式に結晶水が含まれたものでもよい。もちろん、これらの式は鉱物学的又は化学的に純粋な化合物としての式であって、現実の層状無機化合物では、ケイ酸ナトリウムなどの不純物を含む場合があるため、元素分析などによって化学式を定めたものとしても、これらの式と必ずしも一致しない場合があることは、例えば、文献(D. W. Thompson, J. T. Butterworth, J. Colloid Interf. Sci., 151, 236-243(1992))においても記述されていることである。

【0093】

【化1】

$M_x Si_4 (Al_{2-x} Mg_x) O_{10} X_2 \quad \dots (1)$   
(式1においてMはH、Li、Na、Kのうちいずれかひとつであって、XはOH、Fのいずれかであって、xは2未満の正数である。)

【0094】

$Na_{0.33} Si_4 (Mg_{2.67} Li_{0.33}) O_{10} X_2 \quad \dots (8)$   
(式8において、XはOH、Fのいずれかであって、好ましくはOHである。)

$Na_{a-b} (Si_{4-a} Al_a) (Mg_{3-b} Al_b) O_{10} X_2 \quad \dots (9)$   
(式9において、XはOH、Fのいずれかであって、好ましくはOHである。aは4未満の正数、bは3未満の正数であって、a-b>0である。)

【0102】本発明の層状無機化合物の具体例としては、カオリナイト、ハロイサイト、蛇紋石等の1:1型粘土鉱物；タルク、パイロフィライト、スメクタイト、バーミキュライト(上記式中、式2で表されるもの、以下同様)、フッ素四ケイ素雲母(式5)やテニオナイト(式6)を含む雲母等の2:1型粘土鉱物；クロライト等の2:1:1型粘土鉱物；2:1~2:1:1型の中

【化2】

$M_x (Si_{4-x} Al_x) Al_2 O_{10} X_2 \quad \dots (2)$   
(式2においてMはH、Li、Na、Kのうちいずれかひとつであって、XはOH、Fのいずれかであって、xは4未満の正数である。)

【0095】

【化3】

$M_x Si_4 (Mg_{3-x} Li_x) O_{10} X_2 \quad \dots (3)$   
(式3においてMはH、Li、Na、Kのうちいずれかひとつであって、XはOH、Fのいずれかであって、xは3未満の正数である。)

【0096】

【化4】

$M_x (Si_{4-x} Al_x) Mg_3 O_{10} X_2 \quad \dots (4)$   
(式4においてMはH、Li、Na、Kのうちいずれかひとつであって、XはOH、Fのいずれかであって、xは4未満の正数である。)

【0097】

【化5】 $MSi_4 Mg_{2.5} O_{10} X_2 \quad \dots (5)$

(式5においてMはLi、Naのうちいずれかであって、好ましくはNaである。XはOH、Fのいずれかであって、好ましくはFである。)

【0098】

【化6】 $M_2 Si_4 Mg_2 O_{10} X_2 \quad \dots (6)$

(式6においてMはLi、Naのうちいずれかであって、好ましくはLiである。XはOH、Fのいずれかであって、好ましくはFである。)

【0099】

【化7】 $Mg_6 Al_2 (OH)_{16} X_x \quad \dots (7)$

(式7においてXはハロゲン、NO<sub>3</sub>、SO<sub>4</sub>、CO<sub>3</sub>、OHのいずれかもしくは有機酸のアニオン形であって、好ましくはCO<sub>3</sub>である。xはXがハロゲン、OH、NO<sub>3</sub>、一価の有機酸のとき2であって、XがSO<sub>4</sub>、CO<sub>3</sub>、二価の有機酸のとき1である。)

【0100】

【化8】

【0101】

【化9】

間鉱物；イモゴライト等の準晶質粘土鉱物；アロフェン等の非晶質粘土鉱物；ハイドロタルサイト(式7)；等が挙げられる。

【0103】また、スメクタイトには、同型置換された四面体、八面体格子中のイオン種によってモンモリロナイト(式1)、モンモリロナイトが40~80%含まれるベントナイト、バイデライト(式2)等の2八面体型；ヘクトライト(式3、好ましくは式8)、サボナイト(式4、好ましくは式9)、ノントロナイト等の3八面体型；等が含まれる。

【0104】尚、ハイドロタルサイトは、上記式中の式7、具体的には $Mg_6Al_2(OH)_{16}CO_3 \cdot 4H_2O$ で表される層状鉱物であり、 $Mg(OH)_2$ （ブルーサイト：中心に $Mg^{2+}$ を持つ酸素八面体の層が積み重なった構造を持つ）の $Mg^{2+}$ の一部が $Al^{3+}$ に同型置換したものであって正電荷を有するが、層間の $CO_3^{2-}$ によって電気的中性を保っており、陰イオン交換能をもつもので

<表1>

鉱物名	組成*
カオリナイト (Kaolinite)	$Si_2Al_2O_5(OH)_4$
ハロイサイト	$Si_2Al_2O_5(OH)_4 \cdot 2H_2O$
蛇紋石	$Si_2(Mg^{2+}, Fe^{2+})_3O_5(OH)_4$
タルク (Talc)	$Si_4Mg_3(OH)_2O_{10}$
パイロフィライト (Pyrophyllite)	$Si_4Al_2(OH)_2O_{10}$
モンモリロナイト (Montmorillonite)	$MI_xSi_4(Al_{2-x}Mg_x)O_{10}(OH)_2 \cdot nH_2O$
バイデライト (Beidellite)	$MI_x(Si_{4-x}Al_x)Al_2O_{10}(OH)_2 \cdot nH_2O$
ヘクトライト (Hectorite)	$MI_xSi_4(Mg_{3-x}Li_x)O_{10}(OH,F)_2 \cdot nH_2O$
サボナイト (Saponite)	$MI_x(Si_{4-x}Al_x)Mg_3O_{10}(OH)_2 \cdot nH_2O$
ノントロナイト (Nontronite)	$MI_x(Si_{4-x}Al_x)Fe_2O_{10}(OH)_2 \cdot nH_2O$
バーミキュライト (Vermiculite)	$MI_x(Si_{4-x}Al_x)Al_2O_{10}(OH)_2 \cdot nH_2O$
ハイドロタルサイト (Hydrotalcite)	$Mg_6Al_2(OH)_{16}CO_3 \cdot 4H_2O$

\* : MI は1価陽イオンで代表させた交換性陽イオン

【0107】本発明の層状無機化合物の粒径は、均一な分散が行える程度に小さな粒径であれば特に限定はされない。また、層状無機化合物は一般に板状の粒子であり且つ複数の粒子が凝集と劈開を繰り返す動的平衡にあるので、平均粒径の定義を行うこと自体が困難であるから、好ましい平均粒径の範囲を明示することは容易ではないが、強いて言及すれば、光散乱法や電子顕微鏡での観察などの手段によって測定された値が、水中に分散させた状態で、1nm以上20 $\mu m$ 以下が好ましい。更には10nm以上2 $\mu m$ 以下のものが好ましい。

【0108】また、これらはイオン交換能を有することによって色素等の電荷や極性に依りて吸着を行うものと考えられ、イオン交換能は層を構成する金属イオンの置換によって生じた層電荷に由来する。そこで層電荷の絶対値は表1に示した式の組成の原子団について0.2～1程度の値を有することが好ましい。

【0109】また、鉄等の遷移金属イオンを置換イオンとして構造中に又は不純物として含むものは、それによって着色を生じ、また酸化還元特性等を示して副反応を生じる結果、透明性等に劣ることとなるため、遷移金属イオンによる置換がない方が好ましいが、これに限定されるものではない。

【0110】これら粘土鉱物等の層状無機化合物には4級アンモニウム塩などのピラーを立てて層間距離や層間の電荷や極性をあらかじめ調整することもできる。本発

ある。ケイ酸塩鉱物ではないが、しばしば粘土鉱物として取り扱われる。

【0105】上述した本発明の層状無機化合物のうちいくつかの組成を下記表1に示す。

【0106】

【表1】

明の上述した層状無機化合物のうち、より好ましいものは2:1型粘土鉱物であり、特に好ましいものはイオン交換能を有する膨潤性粘土鉱物である。また、膨潤性粘土鉱物のうち、更に好ましいものはベントナイト、スメクタイト、バーミキュライトまたは合成フッ素雲母で代表される膨潤性合成雲母（又はNa型雲母）等の合成雲母（天然の雲母は通常非膨潤性粘土鉱物である。）であり、特に好ましいものは合成ヘクトライトもしくは合成サボナイト等の合成スメクタイト、または合成フッ素雲母である。これらは単独で用いても、2種以上を併用してもよい。

【0111】尚、膨潤作用は交換性のカチオンまたはアニオンを持つことに由来し、層間あるいはカードハウス構造と呼ばれる層状無機化合物の表面に色素を迅速に吸着するため、膨潤性の層状無機化合物を用いるのが好ましい。粘土鉱物はアニオン性物質、カチオン性物質、非イオン性の極性有機化合物を、ハイドロタルサイトはアニオン性化合物を吸着する。層状無機化合物に吸着可能な化合物は、例えば、H. Van Olphen著の成書「An Introduction to Clay Colloid Chemistry, Second Edition」（Krieger Publishment, Malabar）の11章「Interaction of Clays and Organic Compounds」などに詳述されている。

【0112】本発明の上述した層状無機化合物は、合成物、天然物に限らず使用できるが、好ましくは合成物が

用いられる。合成物は、天然物とは異なり、化学的に均一で吸着した色素等を定量的に取り扱うことが可能であり、更に層間に鉄等の有色の金属を含まず透明度が高いため、定量的、光学的取り扱いが可能だからである。尚、ここで、「合成」とは、少なくともスメクタイトの場合は、主に水熱合成法又は溶融法によって製造されたものをいう。天然物を精製して得られる膨潤性粘土鉱物も好ましく用いられる。

【0113】このような層状無機化合物はいくつか市販されており、たとえばコープケミカル(株)製の商品名ルーセントタイトSWNもしくはルーセントタイトSWF(合成ヘクトライト)またはME(フッ素雲母)、クニミネ工業(株)製の商品名スメクトンSA(合成サボナイト)、協和化学工業(株)製の商品名チキソピーW(合成ヘクトライト)または商品名キョーワード500(合成ハイドロタルサイト)、ラボー社製の商品名ラボナイト(合成ヘクトライト)、(株)ナカライテスク社販売の天然ベントナイト、(株)豊順鉱業社製の商品名マルチゲル(ベントナイト)等が挙げられる。

【0114】上述した層状無機化合物は、アミン、ポリエー、各種色素など有機化合物を吸着することが知られており、従来、油、色素などを吸着する水処理剤、ワインやみりん等の製造時の蛋白除去剤、不純物吸着除去による脱色精製剤等として用いられてきた。また、これら層状無機化合物は、メタクロマジーと呼ばれる現象を生じるなど、特定の反応場を与える素材として知られており、更に、最近では天然色素の光安定性を向上させることも知られている。

【0115】しかしながら、本発明においては、この層状無機化合物を分析用試験片の検出層又は検出領域等の検出部に含有させて、試薬の反応により生成される色素等と吸着させることによって、色素等が試料液や反応液等により拡散・溶出されるのを抑制することができることを見出したものである。このように層状無機化合物が色素等の拡散・溶出を抑制するという効果を利用して試験片に含有させることはこれまで試みられていない。

【0116】更に、驚くべきことに、反応層等に前記層状無機化合物を添加しても、検出反応は妨害されない。よって、この層状無機化合物の添加によって、例えば前記4-AAと水素供与体を用いる反応系等を利用した検査を、より正確に、そして溶出を気にせずに簡便に行うことができるのである。

【0117】試験部のうちの層状無機化合物を含有する部分は、好ましくは多孔質構造体であり、材質は特に限定されないが、主として層状無機化合物によって形成されているか、又は、主として親水性ポリマー、メンブランフィルター、ろ紙や布、ガラスフィルターなどの繊維集合体、セルロース又は珪藻土などの有機化合物もしくは無機化合物の微粉末からなる群から選ばれる少なくとも1種の多孔質形成素材と層状無機化合物とによって形

成されているのが好ましい。

【0118】層状無機化合物によって形成されている多孔質構造体としては、主として、層状無機化合物のゾル、ゲル、凝集体、凝結体、又はそれらを乾燥あるいは焼結した多孔質体が挙げられる。多孔質構造体には後述する緩衝剤などを添加してもよい。例えば層状無機化合物の1%分散液の一滴を支持体上に滴下してキャストした後、凍結乾燥することで、吸水性のよい多孔質層を得ることができる。

【0119】支持体はシート状であっても管状又は棒状であってもよく、材質は特に限定されず、ろ紙、不織布、布、ガラスフィルターなどの繊維集合体；ガラスビーズ、ポリマービーズ、二酸化チタンなどの粒状物質；セルロース、珪藻土、可溶性塩類や疎水化多糖類などの粉末、などの粒状物質又は微粉末；メンブランフィルター；ポリエチレンテレフタレート(PET)やポリスチレンなどのプラスチックプレート等の有機高分子；等であってもよい。また、更に好ましくは親水性ポリマーからなるゲル、表面を親水化処理したメンブランフィルター又はプラスチックプレートが挙げられる。

【0120】親水性ポリマーとしては、ポリエチレンオキシド、ポリプロピレンオキシド等のポリアルキレンオキシド；カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロースなどのセルロース誘導体；ゼラチンおよびその誘導体(例えばフタル化ゼラチンなど)；その他多糖類およびその誘導体(アガロース、カラゲナン、キチン、キトサンなど)；ポリビニルアルコール；ポリビニルピロリドン；ポリアクリル酸塩類(ポリアクリル酸ナトリウム等、およびそれらのマレイン酸との共重合体等)；ポリアクリルアミド；ポリメタクリル酸類(ポリヒドロキシエチルメタアクリル酸等)；メタアクリルアミド；ポリスルホン；ポリイミド；ポリスチレン；ポリカーボネート；ポリエーテルエーテルケトン；ポリオキシメチレン；アルギン酸ナトリウム；親水処理された(例えば紫外線照射やシラノール処理によって親水化された)ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリフルオロエチレン等のポリオレフィン系樹脂；などの化学構造を含む重合体、共重合体、会合体等が挙げられる。

【0121】また、前記親水性ポリマーは、架橋剤によるグラフト化、疎水的親和性による会合などによるネットワーク構造を持ち、水に不溶であるものが好ましい。このような親水性ポリマーの具体例としては、グルタルデヒドで架橋されたポリリジン、ポリエチレンオキサイド架橋生成物、ポリアクリルアミドグラフトポリマー、ポリアクリル酸塩グラフトポリマー、デンブナーアクリル酸塩グラフトポリマー等が挙げられる。

【0122】また、親水性ポリマー、メンブランフィルター、繊維集合体、及び有機化合物もしくは無機化合物の微粉末からなる群から選ばれる少なくとも1種の多孔質形成素材と層状無機化合物とがともに試験部に含有さ

れ、前記多孔質構造体を形成していてもよい。このような多孔質構造体を形成させる方法としては、あらかじめ多孔質構造体形成素材と層状無機化合物の混合液を調製しておき、前述の支持体にキャスト又は含浸させる方法、または、あらかじめ多孔質構造体形成素材を用いて多孔質膜など多孔質の支持体を作製しておき、層状無機化合物の分散液又は前記混合液を、その多孔質の支持体にキャスト又は含浸させる方法等が挙げられる。

【0123】多孔質構造体の製造時に層状無機化合物を混合する場合は、例えば親水性ポリマーや微粉末等とともに混練し同時に製膜する方法等がある。また、層状無機化合物を、後述する緩衝剤に溶解又は分散させた緩衝溶液を乾燥させ、この乾燥物を原料に混合することもできる。

【0124】また、層状無機化合物の分散液又は混合液を多孔質の支持体に含浸させる方法の場合、用いる溶媒の種類は特に限定されず、従来公知のものを任意に使用することができるが、例えば蒸留水などの水、エタノールなどのアルコール、アセトンなどのケトン類、ジエチルエーテルなどのエーテル類、酢酸エチルなどのエステル類、クロロホルムなどのハロゲン化炭化水素類、ベンゼンやトルエンなどの芳香族炭化水素類などから、利用する検出反応系等に適したものを選ぶことができる。好ましくは、後述する緩衝剤を用いて緩衝剤に溶解または分散させた緩衝溶液を含浸させるのがよい。溶液または分散液の濃度は、反応系等に応じて適宜選択することができ、特に限定されない。

【0125】次に、層状無機化合物を含有する層又は領域の作製方法を例示する。層状無機化合物を含有する層又は領域を作製するとき、前記層状無機化合物のゾル、ゲル、凝集体、凝結体を乾燥又は焼結した多孔質構造体を用いることができる。例えば、層状無機化合物の1%分散液の一滴をプラスチックシート上にキャストした後、凍結乾燥することで、吸水性のよい多孔質層を得ることができる。

【0126】また、上述した親水性ポリマー、メンブランフィルター、繊維集合体、及び有機もしくは無機微粉末からなる群から選ばれる少なくとも1種の多孔質構造体形成素材を作製に用いることができる。

【0127】親水性ポリマーとしては、ゼラチン、ポリアクリル酸又はその誘導体、ポリアクリルアミド、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリエチレングリコール、多糖類又はその誘導体などが特に好ましい。親水性ポリマーはゲル又はゲルの乾燥体として用いてもよい。親水性ポリマーは、既知の架橋剤の添加などによって架橋度を調節したゲルであってもよい。これらを単独で、或いは組み合わせて用いることができる。

【0128】前記素材と層状無機化合物とを複合した多孔質構造体を得るには、層状無機化合物を試験部に含有させる方法において既に述べた種々の方法を用いること

ができる。例えば、緩衝溶液に分散させた層状無機化合物の1%分散液をろ紙に含浸させ、温風乾燥するという処方で多孔質の領域を得ることができる。またそのろ紙の薄片を、例えばプラスチックシートの上に貼り付ければ多孔質層を得ることができる。また例えば、次に述べる手順を用いることができる。層状無機化合物の3%分散液に、重量比で1:1から4:1となるように調製した所定濃度のポリアクリルアミドの水溶液の同量を混合し、数時間よく攪拌する。必要であれば炭酸ナトリウムあるいは酢酸などの希薄水溶液を加えることによって、混合液のpHを約5~9の間に調整する。また、必要であれば混合液をアルカリ性にし、N,N-メチレンビスアクリルアミドを2%となるように加え、電子線を照射して架橋反応を起こさせてもよい。こうして得られた混合液をプラスチック板の上に塗布し、乾燥させれば多孔質膜を得ることができる。

【0129】こうして作製された層状無機化合物を含有する多孔質構造体は、特に吸水性に優れており、試験片の試験部として好ましく用いられる。もちろん、試験部の作製例はここに述べた例に限られるわけではない。例えば、種々の公知の試験片の試験部の作製例を応用することができる。そのような試験片は、例えば、H. G. Curme, et al., *Clinical Chemistry*, 24(8), 1335-1342(1978)、B. Walter, *Analytical Chemistry*, 55(4), 498A(1983)、近藤朝士「ぶんせき」1984(7), 534、R. F. Zuk, et al., *Clinical Chemistry*, 31(7), 1144-1150(1985)、近藤朝士「ぶんせき」1986(6), 387、特開平2-6541(K. Hildenbrand)、M. P. Allen, et al., *Clinical Chemistry*, 36(9), 1591-1597(1990)、特開平3-163361(E. J. Kiserら)、分析化学便覧第8頁(日本分析化学会編:改訂4版、丸善(1991))、D. Noble, *Analytical Chemistry*, 65(23), 1037A(1993)、特開平5-157745(真鍋秀彦ら)、特開平6-213886(北島昌夫ら)、特開平6-222061(H. Brandtら)等の文献に記載されている。

【0130】層状無機化合物の分散液の濃度や親水性ポリマーとの混合比や調整すべきpHの値は、層状無機化合物の種類、吸着させようとする色素の種類、用いる親水性ポリマーの種類と量、緩衝剤の種類と量、混合液の粘度などをパラメーターとして、必要とする多孔性の程度、多孔質層の膜厚、試験部の機械的強度等を得られるように適した条件を選べばよい。

【0131】以上のように作製した多孔質構造体中に、試料液中の分析対象物質と反応し検出可能な物質を生成する試薬を添加することによって、該多孔質構造体を試験片の反応部として使用することができる。

【0132】層状無機化合物の添加量は、利用する反応系に応じて決定され、用いる層状無機化合物にもよるが、生成物質に対して吸着サイトが少な過ぎて生成物質が吸着されずに溶液中等に残ったり、吸着サイトが多す

ぎて生成物質の吸着に濃度の偏りが生じたりすることのない量が望ましい。

【0133】反応系に添加する層状無機化合物の好ましい量は以下のように決定する。即ち、層状無機化合物は、主として前述の層電荷の程度に応じた量の色素等を吸着するので、各種の層状無機化合物について色素等に対する全吸着サイト数を求めることができる。検出反応系において試薬の濃度が定まれば生成する色素等のおおよそその最大量が算出できるので、層状無機化合物の全吸着サイト数を生成しうる色素等の最大量が越えないようにして、適した量の層状無機化合物を添加することができる。

【0134】吸着の度合いは緩衝剤の組成（pH、イオン強度、錯体を形成する成分等）に影響される。例えば、純水に分散させたスメクタイトは食用色素青色一号（ブリリアントブルー FCF）を吸着しにくい、pH6.5のビスートリス緩衝液〔ビス（2-ヒドロキシエチル）イミノトリス（ヒドロキシメチル）メタンと塩酸から調製されたもの〕中に分散させたスメクタイトはこの色素を迅速に吸着する。

【0135】したがって、緩衝剤の組成、濃度又はpHを変化させることで、あるいは層状無機化合物への吸着において色素等と競合しうる化合物などの添加量を変化させることで、望ましい吸着の程度に調整することができる。前記競合しうる化合物としては、金属イオン、有機アミン類、カルボン酸類、リン酸塩などが挙げられ、また界面活性剤、可溶性ポリマーなども使用できる。

【0136】本発明に用いる緩衝剤、緩衝溶液の種類は、例えば上述したビスートリス緩衝液の他、リン酸緩衝溶液、クエン酸緩衝溶液、N-（2-アセトアミド）イミノ二酢酸緩衝液等が挙げられるが、これらに限定されるものではなく、用いる反応系に応じて適宜選択するのが好ましい。また、緩衝剤のpH、濃度等については、用いる反応系に適した条件を選択することが好ましい。

【0137】緩衝剤の添加方法は特に限定されないが、層状無機化合物を溶解もしくは分散させた緩衝溶液として、またはその乾燥物として層状無機化合物と共に含有させることができる。

【0138】また、試験片の製造にあたり、層状無機化合物の分散液において、半透明のコロイド状の凝集が生じる場合があるが、この凝集体は分散液を攪拌することによって均一に再分散する。また、特に凝集が不都合であるときには、リン酸塩系の緩衝溶液を用いれば層状無機化合物の分散性が向上するので、凝集の発生を抑制することができる。

【0139】また、種々の界面活性剤を試験部に含有させることもできる。界面活性剤の添加により、支持体上に試験部等をコーティングする性能等が向上する。ただし、界面活性剤は、界面に吸着する、物質を分散・溶解

する等の作用があるため、生成した検出可能な物質の層状無機化合物への吸着と競合し、あるいは生成した検出可能な物質の溶解をもたらすことによって、本発明の効果を損なわしめるおそれがある。したがって、本発明において層状無機化合物と組み合わせて用いる界面活性剤としては、生成した検出可能な物質と層状無機化合物との吸着を妨害しないものを選択するのが好ましい。また、界面活性剤の使用量についても、このような妨害が生じない程度の少量を用いるのが好ましい。

【0140】吸着を妨害しない界面活性剤の種類としては、界面活性剤の分子量が生成する色素に比べて極端に大きくないものであり、且つ界面活性剤の有機性値と無機性値が下記式を満足するものが好ましい。

【0141】

$$\text{【数1】 (無機性値)} = (2.37 \pm 0.23) \times (\text{有機性値}) - 186.2 \pm 117.1$$

【0142】上記式は、既知の構造の種々の界面活性剤について吸着阻害効果と無機性値及び有機性値との関係を検討して得られたものである。すなわち、炭素一個の有機性値を20、水酸基の無機性値を100、ポリエチレンオキシドの有機性値を30、その無機性値を60、ニトロ基の有機性値を70、その無機性値を70、などのように官能基や原子ごとにポイントを割り振り、化合物を構成する官能基、原子についてこれらのポイントを合計して無機性値の総和及び有機性値の総和をとり、この無機性値と有機性値とを直交座標にプロットすると、似た性質の化合物は直交座標の同じ領域に位置づけられるので、化合物の構造によらない共通の性質が現れることが有機概念図として知られている（甲田善生、「有機概念図—基礎と応用—」第11頁、三共出版(1984)）。本発明者らは、既知の構造を有する多くの界面活性剤について吸着阻害効果と無機性値及び有機性値との関係を検討し、吸着を阻害しない界面活性剤の種類が有機概念図において上記式を満足することを見出したものである。なお、無機性値、有機性値の算出には、前述の有機概念図に関する成書中の換算データを用いることができるが、前述の数式（数1）は、本間善夫作製のプログラム「パソコン有機概念図」（化学ソフトウェア学会等）中の換算データを用いて得たものである。

【0143】吸着を妨害しない界面活性剤の種類と添加量の選択は、例えば次の（イ）～（ニ）のように実施することができる。

【0144】（イ）所定量のスメクタイト、4-AA、及びN-エチル-N-（2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル）-3, 5-ジメトキシアニリンを含む反応液に過酸化水素を加え発色させる。

（ロ）（イ）と同じ組成の反応液に更に所定の濃度となるように界面活性剤を加え、同様に過酸化水素を加え発色させる。

（ハ）スメクタイトを自然沈降、遠心分離、ろ別などの



適当な手段で分離し、上澄み液またはろ液の色調を分光光度計等で測定して、(イ)、(ロ)のそれぞれにおけるスメクタイトへの生成色素の吸着量を比較する。あるいは、吸着による凝集が観察される場合には、凝集沈殿の程度をもって評価する。

(二) 界面活性剤を添加しないとときと添加したときではほとんど差が見られない界面活性剤の種類と添加量を選択する。

【0145】このような方法で選択された好ましい界面活性剤の種類としては、 $n$ -オクチル- $\beta$ -D-グルコピラノシドなどの糖アルキルエーテル類、 $n$ -オクチル- $\beta$ -D-チオグルコピラノシド、 $n$ -ヘプチル- $\beta$ -D-チオグルコピラノシドなどの糖アルキルチオエーテル類、 $n$ -オクタノイル-N-メチルグルカミド、 $n$ -ノナノイル-N-メチルグルカミドなどの糖アミド類、 $\beta$ -D-フラクトピラノシル- $\alpha$ -D-グルコピラノシドモノデカノエート、 $\beta$ -D-フラクトピラノシル- $\alpha$ -D-グルコピラノシドモノデカノエートなどの糖エステル、N, N-ビス(3-D-グルコナミドプロピル)デオキシコラミドなどが挙げられる。

【0146】また、添加量としては特に限定されず、層状無機化合物全量に対する添加の割合も特に限定されるわけではない。界面活性剤の種類と層状無機化合物の種類と反応系に適した量を選べばよく、たとえば支持体へキャストするときなどに界面張力の低下効果が発揮されるのに十分な量でありかつ最小限となる量を実験的に求

<表2>

試薬	終濃度
POD	1 U/mL
4-AA* <sup>1</sup>	2 mmol/L
EHSDA* <sup>2</sup>	2 mmol/L
ビスートリス緩衝液* <sup>3</sup>	100 mmol/L
過酸化水素	100 $\mu$ mol/L (全量 3 mL)

\*1) 4-アミノベンズリン(4-アミノ-1,2-ジヒドロ-1,5-ジメチル-2-フェニル-3H-ベンゾ[ $\alpha$ ]-オキシリン)

\*2) N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3,5-ジメトキシアニリン

\*3) ビス(2-ヒドロキシエチル)アミノトリス(ヒドロキシメチル)メタン

【0150】尚、使用した試薬は各々下記表3に示す通りである。

<表3>

試薬	試薬濃度	メーカー	試薬純度
POD	30 U/mL	東洋紡(株)	
4-AA	60 mmol/L	和光純薬(株)	試薬特級
EHSDA	60 mmol/L	SIGMA	
ビスートリス	0.25 mmol/L	ナカライテスク(株)	Specially

めるのが望ましい。また、色素等と層状無機化合物との吸着の強さを調整するために添加量を増減してもよい。色素等と層状無機化合物との吸着を調整するために添加する界面活性剤の種類は、先に例示した界面活性剤の種類にかかわらず、反応系に適するように公知の種類を適宜用いることができる。

【0147】

【実施例】以下に、本発明を実施例により具体的に説明する。

【0148】

【実施例1】POD(ペルオキシダーゼ)、色素前駆体として4-AAとN-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3,5-ジメトキシアニリン(以下、EHSDAと略す。)、及び緩衝剤としてビスートリス緩衝液(pH 6.5)を、終濃度が表2の通りになるように取り、そこへ過酸化水素を加えて発色液を得た。得られた発色液30  $\mu$ Lを、層状無機化合物(合成スメクタイト:商品名ルーセントタイトSWN、コープケミカル社製)の1%分散液(溶媒:蒸留水)に含浸し乾燥させたろ紙(東洋濾紙社製No. 2)と、未処理のろ紙に点着させ、その拡散の様子を観察した。発色液は円形に浸透・拡散したとし、その直径の最大部と最小部とを測定してその平均から色素の拡散したスポットの面積を求めた。

【0149】

【表2】

【0151】

【表3】

緩衝液			Prepared
スメクタイト	1%	コープケミカル(株)	
過酸化水素		三徳化学工業(株)	試薬特級

【0152】得られた直径、面積及びスポットの色調を表4に示す。また、発色液が拡散したろ紙の様子を表す模式図を図1に示した。

【0153】  
【表4】

<表4>

	直径 (mm)	面積(mm <sup>2</sup> )	色 調
スメクタイト含浸ろ紙	7~8	44	青紫
未処理のろ紙	20~22	350	青

【0154】スメクタイト分散液を含浸させたろ紙では、未処理のろ紙と比較して色素の拡散が抑えられ、スポットが小さくなった(面積にして約1/8)。しかし、発色液のうち色素を除去した無色の部分は未処理のろ紙と同程度に拡散した。このことから、色素が選択的にろ紙中のスメクタイトと吸着したことが確かめられた。

【0155】また、スメクタイトに含浸したろ紙では未処理のろ紙より、そのスポットの色調が濃いこと、及び色調の短波長側へシフトしたことが目視で観察された。更に、このスメクタイトに含浸したろ紙を水洗しても色素は溶出しなかった。

【0156】スメクタイトをろ紙に添加することにより、色素はろ紙上に吸着され、これによって色素の拡散が防止され、溶出も防止されることがわかった。したがって、本発明による試験片を用いれば、生成した色素が移動したり溶出したりせず、測定の精度と感度を向上させることができることがわかる。また、試験部の乾燥による色素の濃縮や移動がなく、試験片を試料液中に付けたままにしたりしても生成色素の溶出がないので、測定を簡便に実施することができることがわかる。

【0157】

【実施例2】尿試験紙(尿中の亜硝酸塩、ブドウ糖、潜血、ビリルビン、ウロビリノーゲンを測定する多項目試験紙:市販の一般的な試験紙で、対応する各試薬をろ紙に含浸させて試験部とし、校正用の試験部と共にプラスチックフィルムに貼り付けたもの)を一般的な処方で作製したコントロール尿中に浸漬し、ただちに引き上げ、呈色が観察されるまで約30秒放置した後、実施例1で用いたものと同じスメクタイト含浸ろ紙片をその上に押しつけ、色素をスメクタイト含浸ろ紙片に移した。ろ紙片上での色素のにじみを目視観察した。また、このろ紙片を水道水の流水でよく洗浄し、色落ちの様子を目視観察した。

【0158】対照としてスメクタイトで処理していない東洋濾紙No. 2及び同No. 131の二種類のろ紙を

用いて同様の操作を行った。

【0159】各試験の測定方法及び処方は以下の通りである。また、結果を下記表5に示す。

【0160】・亜硝酸塩試験:グリース法

4-アミノベンゼンアルソン酸を酸性条件下、亜硝酸塩と反応させてジアゾニウム塩を生成させ、N-1-ナフチルエチレンジアミン二塩酸塩とカップリングしてアゾ色素を生成させる。処方としては、一枚のろ紙にN-1-ナフチルエチレンジアミン二塩酸塩0.26mg及び4-アミノベンゼンアルソン酸0.57mgを含浸して100分割し、その一枚を試験部とした。一枚で約6 $\mu$ lの溶液を吸収した。

【0161】・グルコース試験:グルコースオキシダーゼによって発生した過酸化水素を、ペルオキシダーゼの触媒作用で、発色指示薬(テトラベースとグアヤク脂、それぞれ色原体)と反応させて酸化発色させる。処方としては、一枚のろ紙にグルコースオキシダーゼ470IU、ペルオキシダーゼ219PU、テトラベース13.0mg、及びグアヤク脂4.3mgを含浸して100分割し、その一枚を試験部とした。一枚で約6 $\mu$ lの溶液を吸収した。

【0162】・潜血試験:ヘモグロビンによるクメンハイドロパーオキシドの分解と、発生する活性期の酸素によるオルトトリジンの酸化発色を利用した方法であり、オルトトリジンの代わりにベンジジン類(3,3',5,5'-テトラメチルベンジジンなど)を用いても同様の効果が期待できる。処方としては、一枚のろ紙にクメンハイドロパーオキシド52.6mg及びオルトトリジン7.6mgを含浸して100分割し、その一枚を試験部とした。一枚で約6 $\mu$ lの溶液を吸収した。

【0163】・ビリルビン試験:酸性条件下で、ジアゾ試薬である2-メチル-5-ニトロアニリンまたはスルファニル酸と亜硝酸ナトリウムからジアゾニウム塩が生じ、ジアゾニウム塩がダイフィリンの存在下ビリルビンとカップリングしてアゾビリルビンを生成する反応を利用した方法であり、処方としては一枚のろ紙に2-メチ

ル-5-ニトロアニリン3.8mg、亜硝酸ナトリウム2.1mg、及びダイフィリン若干量を含浸して100分割し、その一枚を試験部とした。一枚で約6 $\mu$ lの溶液を吸収した。

【0164】・ウロビリノーゲン試験：酸性条件下で3,3'-ジメトキシビフェニル-4,4'-ジアゾニウム四フッ化ホウ素塩とアゾカップリングする反応を利

用したものであり、処方としては、一枚のろ紙に3,3'-ジメトキシビフェニル-4,4'-ジアゾニウム四フッ化ホウ酸塩0.36mgを含浸して100分割し、その一枚を試験部とした。一枚で約6 $\mu$ lの溶液を吸収した。

【0165】

【表5】

<表5>

試 験	色素のにじみ			洗浄による色落ち		
	スメクタイト 含浸	未 処 理 No.2	No.131	スメクタイト 含浸	未処理 No.2	No.131
亜硝酸塩試験	○	×	×	○	×	×
グルコース試験	○	×	×	○	×	×
潜血試験	○	×	×	○	×	×
ビリルビン試験	○	×	×	○	×	×
ウロビリノーゲン試験	○	×	×	○	×	×

色素のにじみ・・・○：にじみなし　×：かなりにじみあり

洗浄による色落ち・・・○：色落ちせず　×：かなり色落ちあり

【0166】表5の結果に示すように、層状無機化合物を含浸したろ紙は、色素がにじまずに吸着し、洗浄によっても色落ちしなかった。したがって、層状無機化合物を含浸したろ紙では色素の拡散が抑制され、溶出も防止されることがわかった。よって、本発明による試験片は、生成した色素が移動したり溶出したりせず、測定の精度と感度の向上が期待できる。また、試験部の乾燥による色素の濃縮や移動がなく、また試験片を試料液中に浸けたままにしても生成色素の溶出がないので、測定を簡便に実施することができる。さらに、多項目試験片では生成した色素が隣接する試験部を汚染することがなくなるので、試験部間の幅を狭めて試験片を小型化することが可能である。

【0167】また、生成色素を未処理のろ紙に染み込ませた状態で遮光せずに室温で空気暴露しておいたところ、変色と退色が観察され、約1ヶ月後には反応直後とは全く異なった呈色状態になったが、一方、層状無機化合物を含有したろ紙に吸着された生成色素は、遮光せずに室温で空気暴露しても、少なくとも3ヶ月間は色調の変化や退色がみられなかった。

【0168】以上の事実は、本発明の試験片を用いれば、例えば患者宅で試料を採取して試験片上で反応呈色させたのち呈色済み試験片を遠隔地の検査センターまで郵送するような場合でも、反応呈色直後と同じ測定結果が得られるなど、本発明の応用性を示す。すなわち、本発明の試験片は呈色が安定であり、乾燥による色素の濃縮や水漏れによる溶出もないので、このような郵送用の試験片としても利用可能である。

【0169】

【実施例3】紫外線処理をしたポリエチレンテレフタレート（PET）フィルム上に、下記表6に示す通りに調製した溶液を、ドクターナイフを用いて、膜厚100 $\mu$ mで塗工し、乾燥した。この塗工膜をPETフィルムごと1cm角に切断し、ガラスで図3のように500 $\mu$ m程度の空間をあけて挟み、反応セルを作製した。この反応セルの模式図を図3に示す。

【0170】この反応セルへ、過酸化水素2mmol/Lを添加し、そのときの発色の様子を観察した。また、スメクタイトを添加しなかった他は同様にして調製した溶液を用いて、同様に反応セルを作製し、発色の様子を観察した。

【0171】

【表6】<表6>

試薬	終濃度
POD	1U/mL
4-AA	2mmol/L
EHSDA	2mmol/L
ビスートリス緩衝液	100mmol/L
スメクタイト*1	0.3%
HPC-M*2	1%

\*1)スメクタイトSWN(合成スメクタイト:ユブケミカル社製)

\*2)ヒドロキシアパタイト

【0172】スメクタイト無添加の塗工膜では膜中から

生成色素の溶出が観察されたのに対し、スメクタイトを添加した場合は、生成色素の溶出は観察されなかった。

【0173】

【実施例4】多孔質構造体の検出層を有する本発明の試験片の作製処方例を示す。この試験片の模式図を図4に示す。

【0174】ろ紙(Whatman社製、2Chr)を、下記表7に示す通りに調製した酵素GOD(グルコースオキシダーゼ)とPOD(ペルオキシダーゼ)を含む試薬溶液に浸漬し、40℃で30分間乾燥させた。このろ紙を5mm×5mmに切断し、5mm×100mmの白色のプラスチックフィルムの一端に両面テープを用いて貼り付け、前記ろ紙を試験部とする試験片を作製した。

【0175】

【表7】<表7>

試薬	終濃度
GOD	100U/mL
POD	100U/mL
4-AA	5g/L
EHSDA	3g/L
リン酸緩衝液(pH7.0)	0.1mol/L
スメクタイト	1%

【0176】この試験片においては、血漿の6μlをピペットで試験部に点着するか又はコップに採取した尿に本試験片を浸漬し、反応を進行させた後、検出層の発色の強度を反射率計などで測定して血漿又は尿中のグルコース濃度を測定することができる。本発明における層状無機化合物を含む多孔質構造の層は、本実施例の試験片においては、試料吸入層と試薬層と反応層を兼ねた検出層として利用することができる。

<表9>

試薬	終濃度
ビスートリス緩衝液(pH6.5)	0.1mol/L
スメクタイト	1%

【0181】この試験片においては、キュベットに取った血漿又はコップに採取した尿に本試験片の試料吸入領域を浸漬する。試料液が試料吸入領域、拡散領域を通過し、反応領域に到達して試薬と混合して反応した反応液となり、反応時間を調整する領域と保持領域を通過した後、試験片を引き上げる。保持領域における呈色の強度を反射率計などで測定して、血漿又は尿中のグルコース濃度を測定する。

【0182】本発明による層状無機化合物を含む多孔質構造は、この例の試験片において反応液中の検出可能な

【0177】

【実施例5】本発明の多孔質構造の検出領域を有する試験片の作製方法の例を示す。この試験片の模式図を図5に示す。

【0178】ろ紙(Whatman社製、2Chr)を、下記表8に示す通りに調製した酵素GOD(グルコースオキシダーゼ)とPOD(ペルオキシダーゼ)を含む試薬溶液に浸漬し、40℃で30分間乾燥させた。このろ紙を5mm×5mmに切断し、5mm×100mmの別のろ紙(Whatman社製、2Chr)の所定の位置(図5の反応領域)に圧着によって接合する。次に、新たなろ紙(Whatman社製、2Chr)を、下記表9に示す通りに調製した層状無機化合物の分散液に浸漬し、室温で自然乾燥させる。このろ紙を5mm×5mmに切断し、先に反応領域を設けた5mm×100mmのろ紙(Whatman社製、2Chr)の所定の位置(図5の保持領域)に圧着によって接合する。こうして作製した試験片は、試料吸入領域、拡散領域、反応領域、検出可能な物質を吸着する保持領域、余分な試料を吸収する領域とを備えており、検出領域は保持領域となっている。

【0179】

【表8】<表8>

試薬	終濃度
GOD	100U/mL
POD	200U/mL
4-AA	5g/L
EHSDA	3g/L
リン酸緩衝液(pH7.0)	0.1mol/L

【0180】

【表9】

物質(色素)を吸着する保持領域を兼ねた検出領域として利用できる。

【0183】

【発明の効果】本発明の試験片によれば、色素等が拡散・溶出しにくく、より高感度かつ正確で簡便な分析が可能となる。

【図面の簡単な説明】

【図1】 本発明の実施例1におけるスメクタイト含浸ろ紙上の色素の拡散状態を表す模式図である。

【図2】 本発明の実施例1における未処理ろ紙上の色

素の拡散状態を表す模式図である。

【図3】 本発明の実施例3における反応セルの模式図である。

【図4】 本発明の実施例4における試験片の模式図である。

【図5】 本発明の実施例5における試験片の模式図である。

【符号の説明】

1・・・色素のスポット

2・・・色素を除かれた発色液

3・・・ガラス

4・・・塗工膜

5・・・PET

6・・・試薬を含浸させたろ紙（検出層）

7・・・両面テープ（接着層）

8・・・層状無機化合物の分散液を含浸させたろ紙

9・・・試薬を含浸させたろ紙

10・・・ろ紙

11・・・試料吸入領域

12・・・拡散領域

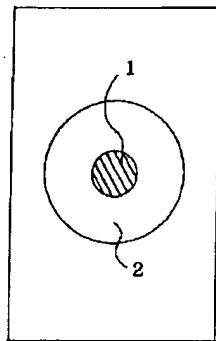
13・・・反応領域

14・・・反応時間を調整する領域

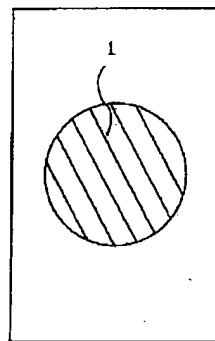
15・・・保持領域

16・・・余分な試料などを吸収する領域

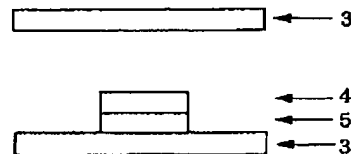
【図1】



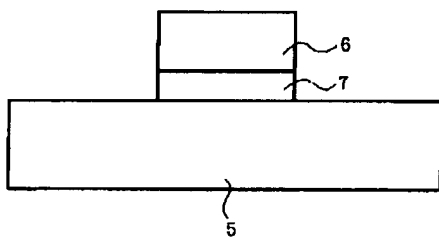
【図2】



【図3】



【図4】



【図5】

